

**Untersuchungen zur Wirkung von
Opiaten und Neurohormonen
an klonalen permanenten Zellkulturen
des Nervensystems**

Jörg Traber

1976

Untersuchungen zur Wirkung
von Opiaten und Neurohormonen
an klonalen permanenten Zellkulturen
des Nervensystems.

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der
Ludwig - Maximilians - Universität
München

vorgelegt
von
Jörg Traber
aus Stuttgart
München 1976

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann
- Tag der mündlichen Prüfung: 16. Juli 1976



Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 1973 bis Dezember 1975 auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Dr. B. Hamprecht am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, (Leitung Prof. Dr. F. Lynen) ausgeführt.

Herrn Dr. B. Hamprecht bin ich für die ausgezeichnete Anleitung zu dieser Arbeit, für viele anregende Diskussionen und für die Ermöglichung eines dreimonatigen Aufenthaltes am National Heart and Lung Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, zu großem Dank verpflichtet.

Frau K. Fischer, Frau C. Buchen und Frau S. Latzin danke ich für ihre fleißige und zuverlässige Mitarbeit.

Ferner gilt mein Dank allen, die diese Arbeit durch die Überlassung von Hormonen und Drogen unterstützt haben. Dr. R.J. Gullis danke ich für cGMP-Messungen.

Der Max-Planck-Gesellschaft und dem Sonderforschungsbereich 51 der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle und materielle Unterstützung während der Ausführung dieser Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. Einleitung

1. Aufgabe und Stellung des Systems des deutschen
rechtswissenschaftlichen Unterrichts
- II. Einleitung

B. Darstellung

1. Darstellung

1. Darstellung

2. Darstellung

3. Darstellung

4. Darstellung

Meinen Eltern

5. Darstellung

6. Darstellung

7. Darstellung

8. Darstellung

9. Darstellung

10. Darstellung

11. Darstellung

12. Darstellung

13. Darstellung

14. Darstellung

15. Darstellung

16. Darstellung

17. Darstellung

18. Darstellung

19. Darstellung

20. Darstellung

21. Darstellung

22. Darstellung

23. Darstellung

24. Darstellung

25. Darstellung

26. Darstellung

27. Darstellung

28. Darstellung

29. Darstellung

30. Darstellung

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung	1
I. Modelle zum Studium der Biochemie des Nerven- systems: Klonale permanente Zell-Linien	1
II. Zielsetzung	7
B. Ergebnisse	9
I. Prostaglandine	9
1. Bedeutung	9
2. Prostaglandinsynthese	9
2.1. Syntheseweg	9
2.2. Methoden zur Bestimmung der Bildung von Prostaglandinen	12
2.3. Aufnahme von Vorläuferfettsäuren in Gliomazellen	15
2.4. Prostaglandinsynthese in Anwesenheit von Vorläuferfettsäuren in Gliomazellen	18
2.5. Beurteilung der Ergebnisse	24
3. Prostaglandinwirkung (Kurzzeiteffekte)	26
3.1. cAMP und Prostaglandine	26
3.2. Regulation der cAMP-Spiegel in der Zelle Messung intrazellulärer cAMP-Spiegel	26
3.3. Wirkung von Prostaglandinen auf die cAMP- Spiegel von Neuroblastoma x Glioma-Hybrid- zellen	28
3.4. Prostaglandin-Antagonisten	32
3.5. Wirkung der Prostaglandin-Antagonisten 7-Oxaprostinsäure und SC19220 auf Neuroblastomazellen	34
4. Prostaglandinwirkung (Langzeiteffekte)	38

	Seite
II. Adenosin und seine Derivate	14
1. Kurzzeiteffekte mit Adenosin und seinen Derivaten	14
2. Langzeiteffekte mit Adenosin	47
III. Studien zur akuten Wirkung von Opiaten und Neurotransmittern	49
1. Opiate und Narkotica	49
1.1. Vorbemerkung	49
1.2. Morphin- und Prostaglandinwirkung in Neuroblastoma- und Neuroblastoma x Glioma-Hybrid-Zellen	52
2. Neurotransmitter	68
2.1. Vorbemerkung	68
2.2. Wirkung von Neurotransmittern in Neuroblastoma- und Neuroblastoma x Glioma-Hybrid-Zellen	69
(a) Adrenerge Agonisten	69
(b) Cholinerge Agonisten	73
2.3. Sind die Rezeptoren für AcCh, NA und Morphin identisch?	77
3. Die Rolle des cGMP	80
Diskussion des Zusammenspiels von Adenylat- und Guanylatcyclase anhand von Modellvorstellungen und Versuchen	
4. Ist Morphin ein Neurotransmitter?	91
Diskussion der akuten Morphineffekte	
IV. Optimierung der Inkubationsbedingungen	94
1. Einflüsse von pH-Wert und Temperatur	94
2. Einflüsse der Mediumzusammensetzung	96
3. Einflüsse von Serum und Mediumwechsel	101

	Seite
V. Studien zur Langzeitwirkung von Opiaten und Neurotransmittern	105
Biochemische Korrelate für Morphintoleranz, -abhängigkeit und -entzugssyndrom	
1. Langzeitinkubationen mit morphinähnlichen Substanzen, cholinergen und adrenergen Agonisten	105
2. Weitere Eigenschaften morphinvorbehandelter Zellen	115
Ändern morphinvorbehandelte Zellen ihre Sensitivität gegenüber PGE_1 und Morphin?	
3. Wie hängen akute und chronische Wirkungen von Opiaten und Neurotransmittern zusammen? Modellvorstellungen und Versuche	121
4. Diskussion der Langzeiteffekte	128
Das "Opiat-Neuron"	
In vivo-Befunde, die sich mit unseren Ergebnissen korrelieren lassen	
VI. Untersuchungen über die Gegenwart weiterer Hormonrezeptoren an Hybridzellen	132
C. Experimenteller Teil	138
I. Apparate, Geräte, Hilfsmittel	138
1. Zellkultur	138
2. cAMP-Bestimmung	139
3. Prostaglandinbestimmung	140
4. Sonstiges	140
II. Chemikalien	142
1. Zellkultur	142
2. cAMP-Bestimmung	142
3. Prostaglandinbestimmung	143
4. Sonstiges	143

	Seite
III. Zellkultur	146
1. Verwendete Zell-Linien	146
2. Methoden	147
2.1. Verwendete Lösungen	147
2.2. Subkultivierung von Zellen	150
2.3. Vorbereitung der Zellen zum Einfrieren	151
2.4. Zellernte für Prostaglandinbestimmung	151
IV. cAMP-Bestimmung	152
1. Isolierung von cAMP-Bindungsprotein	152
2. Inkubation von Zellen mit Hormonen	156
Extraktion und Reinigung der	
cyclischen Nucleotide	
2.1. Kurzzeitinkubation und Extraktion	156
der cyclischen Nucleotide	
2.2. Langzeitinkubation	158
2.3. Anionenaustauscherchromatographie	159
a) Zellextrakte	159
b) Inkubationsmedien	163
c) Regenerierung der Säulen	163
3. Proteinbindungstest	163
V. Prostaglandinbestimmung	167
1. Zellinkubation mit Vorläuferfettsäuren	167
2. Extraktion der Prostaglandine aus	167
biologischem Material	
3. Trennung der Prostaglandine in die	168
drei Hauptgruppen	
4. Messung der Prostaglandinsynthese	170
durch Umwandlung von radioaktiven	
Vorläuferfettsäuren	
Dünnschichtchromatographie	
5. Absolutbestimmung von Prostaglandinen	171
mit Hilfe der radioimmunologischen	
Bestimmungsmethode	

VIII

	Seite
5.1. Herstellung von Antikörpern	171
5.2. Bindungskapazität von Antiseren gegen PGA, PGE und PGF	175
5.3. Erstellung einer Eichkurve und Messung prostaglandinhaltiger Proben	179
VI. Proteinbestimmung	179
D. Zusammenfassung	181
E. Literaturverzeichnis	183
Lebenslauf	197

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

AcCh	Acetylcholin
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BUDR	5-Bromodesoxyuridin
cAMP	Adenosin-3':5'-cyclisches Monophosphat
cGMP	Guanosin-3':5'-cyclisches Monophosphat
Ci	Curie
cpm	gemessene radioaktive Zerfälle pro min (counts per min)
DBCA	N ⁶ ,O ² '-Dibutyryl-cAMP
DBCg	N ² ,O ² '-Dibutyryl-cGMP
DEAE-Cellulose	Diäthylaminoäthylcellulose
DHGLS	Dihomo- γ -linolensäure (8.11.14.-Eicosatriensäure)
Dimethyl-POPOP	1,4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyloxazolyl)- Benzol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
dpm	tatsächliche radioaktive Zerfälle (desintegrations per min)
EC50	Konzentration, bei der 50 % der maximalen Stimulation erreicht wird
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
FCS	fötale Kälberserum (fetal calf serum)
GABA	γ -Aminobuttersäure
h	Stunde (n)
IC50	Konzentration, bei der 50 %ige Hemmung erreicht wird
K _M	Michaeliskonstante
MIBX	1-Methyl-3-Isobutylxanthin
min	Minute (n)
NA	Noradrenalin
7-OPS	7-Oxaprostinsäure (siehe Abb. 17A)

PGA, B, E, F	Prostaglandin A, B, E, F,
PPO	2, 5-Diphenyloxazol
RIA	Radioimmunoassay
RSA	Rinder serumalbumin
SC19220	1-Acetyl-2-(8-chloro-10, 11-dihydrodibenz (b; f) (1, 4) oxazepin-10-carbonyl)hydrazin (siehe Abb. 17B)
sec	Sekunde (n)
6-TG	6-Thioguanin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ZNS	Zentrales Nervensystem

A. EINLEITUNG

I. Modelle zum Studium der Biochemie des Nervensystems: Klonale permanente Zell-Linien.

Das komplexe Organ Gehirn ist zusammengesetzt aus einer Vielzahl verschiedener Zelltypen. Sieht man ab von den Zellen des Blutgefäßsystems, so unterscheidet man zwei Zellklassen: die Nervenzellen (Neuronen) und die Gliazellen, die jeweils etwa 50 % der Gehirnmasse ausmachen.

Differenzierte Zellen wie die des Nervensystems lassen sich anhand ihrer Luxusfunktionen charakterisieren. Luxusfunktionen sind Funktionen, die für das Überleben der Zelle, nicht aber des Gesamtorganismus entbehrlich sind. Luxusfunktionen der Neuronen sind Reizaufnahme, elektrische Erregbarkeit der Plasmamembranen, Reizleitung, Bildung von Schaltstellen (Synapsen) mit anderen Zellen und Übertragung von Reizen auf diese Zielzellen. Der Reizaufnahme dienen spezifische Rezeptoren. Sie "empfangen" die in Form von Neurohormonen ("input") auf die Zellen treffenden Signale. Zu den Neurohormonen zählt man neben experimentell erwiesenen und potentiellen Neurotransmittern (z.B. AcCh, NA, Dopamin, Serotonin, Histamin, Glutamat, Glycin, GABA, Taurin, Substanz P) auch Substanzen, die wahrscheinlich als Modulatoren neuronaler Aktivität wirken (Prostaglandine, Adenosin) (1).

Die Neuronen empfangen nicht nur hormonelle Signale, sondern sind auch in der Lage, selbst Neurohormone, also auch Neurotransmitter, zu synthetisieren. Entsprechend des von ihnen zur Signalübertragung verwendeten Neurotransmitters ("output") lassen sich die Neuronen einteilen. So gibt es cholinerge, dopaminerge, adrenerge usw. Neuronen. In der Natur sind von den theoretisch möglichen "input"- "output"-Kombinationen bei Neuronen wahrscheinlich nur wenige verwirklicht worden. In der Klein-

hirnrinde z.B. unterscheidet man nur fünf Arten von Neuronen (2). Ihre präzise eingehaltene relative Lage und ihre Synapsen sind genetisch festgelegt.

Von den Neuronen lassen sich die Gliazellen unterscheiden, die 90 % der Zellzahl des Gehirns ausmachen. Die Gliazellen im Gehirn unterteilt man in Oligodendrocyten und Astrocyten (Sternzellen). Erstere umhüllen die von den Neuronen ausgesandten Nervenfasern (Axons) ähnlich wie eine Kabelisolierung ein Kabel umgibt (Myelinscheiden). Astrocyten können die Gefäße, insbesondere Blutkapillaren des Nervensystems, und die gesamte Oberfläche von Neuronen umgeben (3,4). Möglicherweise sind die Gliazellen am Stoffaustausch zwischen Neuronen und Blutkapillaren beteiligt. Die früher übliche Sicht der Gliazellen als inaktives Einbettungsmaterial für Neuronen (glia, griechisches Wort für Leim) mußte aufgegeben werden. Für eine aktive Funktion der Gliazellen sprechen heute folgende Beobachtungen:

- 1) Nach Durchtrennung von Nervenfasern verkümmern die sie umgebenden Myelinscheiden ("Wallersche Degeneration") (5).
- 2) Durch Zeitrafferkinematographie ist gefunden worden, daß Gliazellen sich bei Aktivität des Nervengewebes kontrahieren können (6).
- 3) Gliazellen sind elektrisch passive Zellen. Sie können auf Grund ihrer hohen Permeabilität für Kaliumionen diese beim Aktionspotential von den Neuronen abgegebenen Ionen rasch aufnehmen (7). Dadurch verhindern sie wahrscheinlich eine ständige Herabsetzung der Reizschwelle der Neuronen.
- 4) Gliazellen, die die Axons von Tintenfischen umgeben, beantworten die Reizung ihrer Oberfläche durch AcCh mit langsamen Hyperpolarisationen (8,9,10). Dies könnte bedeuten, daß die Kaliumpermeabilität der Gliamembran in der Nähe aktiver cholinergischer Synapsen stark erhöht wird (siehe Punkt 3).
- 5) Gliazellen enthalten ein für das Nervensystem spezifisches Protein (S-100-Protein) in hoher Konzentration (11,12).
- 6) Astrocyten enthalten Glykogen (13).

Sowohl Neuronen als auch Gliazellen sind somit biologisch äußerst aktive Zellen. Um die Biochemie der interzellulären Kommunikation zwischen verschiedenen Neuronen und zwischen Neuronen und Gliazellen untersuchen zu können, bedarf man eines geeigneten Untersuchungsobjektes. Untersuchungen an Schnitten oder Homogenaten von Gehirnen höherer Tiere sind mit einer Reihe von Nachteilen behaftet. Man erhält über alle Zellen gemittelte Durchschnittswerte und muß berücksichtigen, daß äußere Einflüsse Ketten von Wechselwirkungen verschiedener Zellen auslösen können; oder daß Bestandteile, die vorher auf verschiedene Zellen verteilt waren, im Homogenat in einem Kompartiment vorliegen. Beobachtete Effekte lassen sich kaum einem bestimmten Zelltyp zuordnen.

Lebende Zellen für biochemische Untersuchungen liefern Primärkulturen von embryonalem Nervenzellgewebe (14). Obwohl man je nach Wahl der Kulturbedingungen bestimmte Zelltypen (Neuron, Glia) anreichern kann, erhält man auch mit diesem Verfahren ein Zellgemisch. Die zeitraubende Methode (Sezierung von Embryonen) erlaubt es häufig nicht, ausreichendes Zellmaterial für biochemische Untersuchungen zu bekommen.

Einen anderen Weg wies die Entwicklung permanenter Zell-Linien aus menschlichen oder tierischen Tumoren. Die in Kultur gezüchteten Nachkommen von Einzelzellen aus Tumoren (Klone) können differenzierte Eigenschaften des ursprünglichen Gewebes besitzen. Ein weiterer Vorteil ist die unbeschränkte Vermehrbarkeit. Für manche biochemische Untersuchungen, z.B. des Nervensystems, stellen solche Zellen bislang die einzige Quelle homogenen und ausreichend definierten Zellmaterials dar. Pionierarbeit auf diesem Gebiet wurde im Labor von Gordon Sato geleistet. So wurden Zell-Linien entwickelt und an Kulturbedingungen adaptiert, die Steroide, ACTH oder Wachstumshormon synthetisieren (15,16).

Gabriella Augusti-Tocco gelang es im selben Labor erstmals, Neuroblastomazellen an Kulturbedingungen zu adaptieren und nachzuweisen, daß sie differenzierte Funktionen des Nervensystems besitzen (17). Das Neuroblastom war ein spontaner Tumor, der in einer neugeborenen Maus in der Nähe der Wirbelsäule gefunden und seit über 30 Jahren als Transplantations-tumor weitergezüchtet worden ist. Daneben werden auch Neuroblastomazellen aus Mensch (18) und Ratte (19) studiert. Einige Klone enthalten Cholin-Acetyltransferase, das Marker-enzym für cholinerge Neuronen (19-25), das die Bildung von AcCh katalysiert. In anderen Klonen findet man Tyrosinhydroxylase (26,27) und Dopamin- β -hydroxylase (28-30), beides Markerenzyme für adrenerge Neuronen, welche NA oder Dopamin synthetisieren. Neuroblastomazellen enthalten Acetylcholinesterase (31), können zur Aussendung Nervenfasern ähnelnder Fortsätze veranlaßt werden (17, 31-38), "feuern" nach elektrischer (39, 40) oder chemischer (41-43) Reizung Aktionspotentiale und besitzen Rezeptoren für PGE₁ (44-46), Adenosin (47,48), AcCh und NA (49-55) und Opiate (56-59).

Auch für Gliazellen gibt es Modellsysteme. Der häufigst verwendete Klon, C6, stammt aus einem chemisch induzierten Gehirntumor (Gliom) einer Ratte (60). Daneben sind Zell-Linien aus einem menschlichen Astrocytom (61) und einem Schwannzell-Tumor (62) bekannt geworden. Die Ratten-Gliomazellen enthalten S-100-Protein (60), aber nicht die für die Synthese von AcCh oder NA notwendigen Enzyme. Sie können ebenfalls lange Fortsätze bilden (63), tragen Rezeptoren für NA (64) und PGE₁ (65), antworten nicht auf elektrische Reizung (66,67), wohl aber auf chemische durch AcCh (66).

Völlig neue, künstliche Zelltypen lassen sich durch Zellfusion erzeugen. Als Harris und Watkins (68) tierische Zellen verschiedenster Herkunft fusionierten, machten sie sich die Beobachtung Okadas (69,70) zunutze, daß Sendai-Virus, ein

Parainfluenza-Virus, Zellen in hoher Ausbeute zu mehrkernigen Riesenzellen (Heterokaryonten) verschmilzt. Gelegentlich teilen sich solche Zellen und bilden dabei eine für die Chromosomen aller Kerne gemeinsame Teilungsspindel. Die entstehenden Tochterzellen enthalten dann nur einen Kern mit den Chromosomen beider Elternzellen und werden deshalb als Hybridzellen bezeichnet (Abb. 1). Durch Fusion von Mäuse-Neuroblastomazellen (Linie N18TG2) mit Ratten-Gliomazellen (Linie C6-BU-1) und anschließende Klonierung wurden zwei Klone von Hybridzellen (108CC5 und 108CC15) erhalten (71-73).

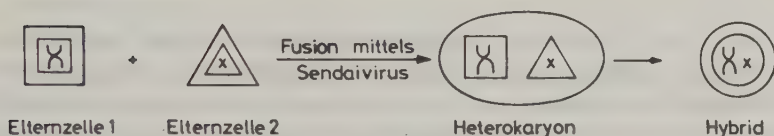


Abb. 1. Schematische Darstellung der Zellfusion (249).

Die Hybridzellen haben im Gegensatz zu ihren Elternzellen eine hohe Aktivität an Cholin-Acetyltransferase (71-73) und Dopamin- β -Hydroxylase (30), bilden nach Behandlung mit dem cAMP-Analogon DBCA lange, neuritenähnliche Fortsätze (30, 72) und enthalten klare und "dense-core" Vesikel von 500-700 bzw. 1000-2000 Å Durchmesser (74). Im cholinergen bzw. adrenergen Nervensystem dienen solche Vesikel als Speicher für AcCh bzw. NA. Die Hybride sind groß (40-70 µm Durchmesser) und elektrisch oder chemisch durch AcCh (72) oder NA (50) zur Erzeugung von Aktionspotentialen reizbar. Dies macht sie nicht zuletzt wegen ihrer stabilen Membran für elektrophysiologische Studien geeignet. Sie haben Rezeptoren für PGE₁ (65), NA (50), AcCh (49, 51) und Opiate (56-59, 75-80). Hybridzellen des Klon 108CC15 dienten für einen Großteil der in dieser Arbeit

beschriebenen Versuche als "Modellneuronen".

Permanente klonale Zell-Linien des Nervensystems einschließlich der Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen sind daher einfache Modellsysteme, um differenzierte Funktionen des Nervensystems zu studieren. Wegen der Homogenität des kultivierten Zellmaterials und dessen oft nahezu unbegrenzter Vermehrbarkeit, lassen sich, wie in der Bakteriologie, leicht Versuchsserien mit Replikakulturen durchführen. Die Zellkultursysteme erinnern nicht nur von der Methodik her an die Mikrobiologie. Die neulich gestellte Frage, ob Neuroblastomazellen die Escherichia Coli der Neurobiologie seien, liegt daher nahe (81).

Vor allem am Beispiel der Morphinwirkung soll in dieser Arbeit gezeigt werden, daß man Probleme, die im Tier- oder Gewebversuch kaum lösbar sind, im Modellzellsystem einer Aufklärung näher bringen kann. Die Merkmalkombinationen einer Modellzelle können einmalig sein. Dann ist es schwierig, sie einer bestimmten Zelle im Körper zuzuordnen. Das ist aber auch nicht nötig. Man wählt den Modell-Zelltyp aus, bei dem interessierende Eigenschaften am besten studiert werden können. Ergebnisse aus Versuchen mit Zellkulturen müssen in gezielten Tierversuchen auf ihre physiologische Bedeutung geprüft werden.

II. Zielsetzung.

Die räumliche Nachbarschaft und manche Eigenschaften von Glia- und Nervenzellen im Gehirn legen die Annahme einer biochemischen Kopplung zwischen diesen Zellen nahe. In der folgenden Hypothese sei das Prinzip einer solchen Kopplung beispielhaft skizziert. Sie stützt sich auf die Erhöhung des cAMP-Spiegels in Gliomazellen durch NA. Gliomazellen synthetisieren mehr Prostaglandin in An- als in Abwesenheit von DBCA (63). Dies kann mehrere Gründe haben:

- 1) Verlangsamung des Zellwachstums durch DBCA und damit ein pro Zelle gesteigertes Angebot an aus dem Serum stammenden Vorläufern.
- 2) Aktivitätserhöhung der Phospholipase durch DBCA und damit ebenfalls erhöhtes Vorläuferangebot.
- 3) Erhöhung der Aktivität der Prostaglandinsynthetase durch DBCA.
- 4) Verlangsamung des Abbaus von Prostaglandin.

Nimmt man an, daß cAMP durch DBCA ersetzt werden kann, so müßte NA in Gliomazellen die Synthese und Ausschüttung von Prostaglandin steigern können. PGE_1 erhöht die cAMP-Spiegel von Neuroblastomazellen (44-46) und Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen (65, 75) stark. Auf das Gehirn übertragen würde das bedeuten, daß PGE_1 aus Gliazellen den cAMP-Spiegel angrenzender Neuronen erhöht. Der erhöhte cAMP-Spiegel könnte eine Erhöhung der Geschwindigkeit der Neurotransmittersynthese bewirken. In der Tat ist in mit DBCA behandelten Neuroblastomazellen (82) und Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen (30) die spezifische Aktivität der an der Synthese von NA beteiligten Enzyme Tyrosinhydroxylase (82) bzw. Dopamin- β -Hydroxylase (30) gesteigert. Dementsprechend vermehrt gebildetes NA könnte in der benachbarten Gliazelle den cAMP-Spiegel und damit die Produktion von Prostaglandin erhöhen. Damit wäre der sich selbst verstärkende Kreislauf geschlossen (Abb. 2). Der

Schwingkreis könnte durch Erhöhung der cAMP-Phosphodiesterase-Aktivität gedämpft werden. Tatsächlich wurde eine Steigerung der Aktivität dieses Enzyms als Folge der Erhöhung des cAMP-Spiegels beobachtet (83-85).

Um diese Hypothese zu beweisen, erschien es notwendig, Prostaglandinsynthese und -wirkung an Modellzellen zu untersuchen. Der Einsatz von Inhibitoren der Synthese bzw. der Wirkung von Prostaglandin sollte diese Studien erleichtern.

Im Laufe der Untersuchungen hat sich ergeben, daß Neuroblastomazellen und Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen auf Opiate reagieren. Diese Entdeckung hat den Inhalt dieser Arbeit entscheidend mitbestimmt. Zum erstenmal war es möglich geworden, den Mechanismus der Wirkung von Opiaten auf zellulärer Ebene an homogenem Zellmaterial zu untersuchen.

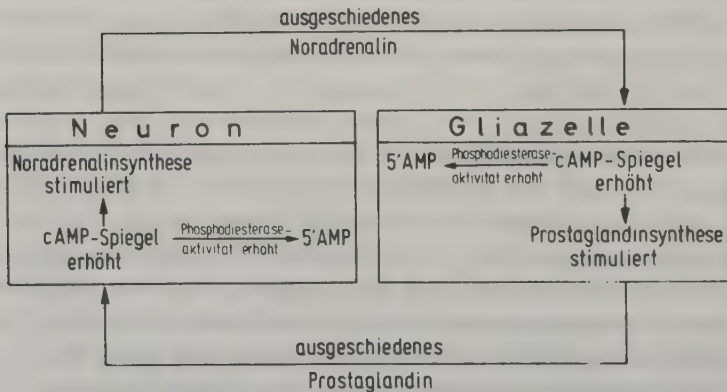


Abb. 2. Postulierter Regelkreis der Neuron-Glia-Wechselwirkung.

B. ERGEBNISSE.

I. Prostaglandine.

1. Bedeutung.

Vor etwa vierzig Jahren berichteten Kurzrok und Lieb (86) und wenig später von Euler (87) und Goldblatt (88) über die muskelkontrahierende Wirkung menschlicher Samenflüssigkeit auf Gewebestreifen des Uterus. Die wirksame Substanz wurde bald darauf als das Derivat einer Fettsäure erkannt. Erst in den 60er Jahren gelang es den Arbeitskreisen Bergström (89,90) und van Dorp (90), die chemische Struktur der Verbindungsklasse der Prostaglandine aufzuklären. In den letzten Jahren nahm die Forschung über diese neue Hormonklasse einen stürmischen Aufschwung (91-99). Drei Charakteristika der Prostaglandine seien herausgestellt:

- 1) Das ubiquitäre Vorkommen (in allen untersuchten Geweben).
- 2) Die Wirksamkeit bei sehr niedrigen Konzentrationen.
- 3) Die Vielfalt physiologischer Phänomene, an denen Prostaglandine beteiligt sind, und
- 4) die Verschiedenartigkeit der Organe, in denen sie wahrscheinlich eine wichtige Rolle spielen.

Über die physiologische Rolle der Prostaglandine im Nervensystem ist nichts bekannt.

2. Prostaglandinsynthese.

2.1. Syntheseweg.

Prostaglandine sind zyklische, sauerstoffhaltige C_{20} -Fettsäuren, die Prostansäure (Abb. 3) als Grundkörper enthalten.

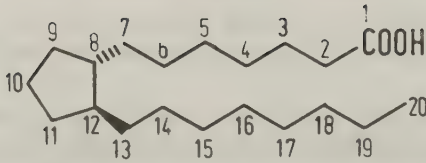


Abb. 3. Prostansäure.

Ein mikrosomales Synthetase-System katalysiert die Bildung von PGA, E und F aus mehrfach ungesättigten C_{20} -Fettsäuren durch Einbau von drei Atomen Sauerstoff (Abb. 4). Ein Endoperoxid tritt als Zwischenprodukt auf (100) (Abb. 5).

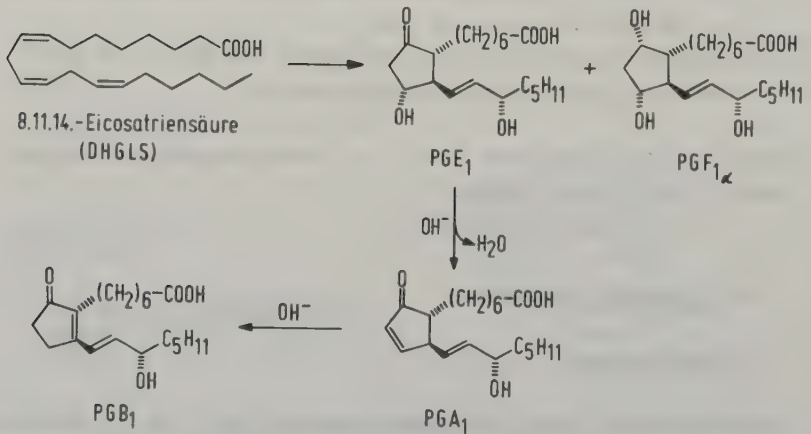


Abb. 4A. Prostaglandine und ihre Vorläuferfettsäuren.

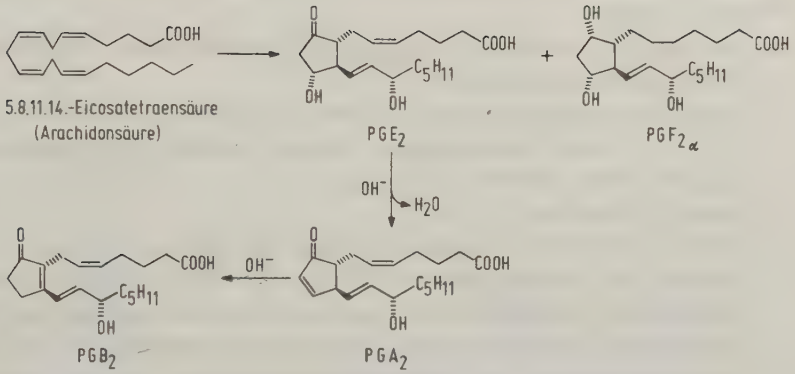


Abb. 4B. Prostaglandine und ihre Vorläuferfettsäuren.

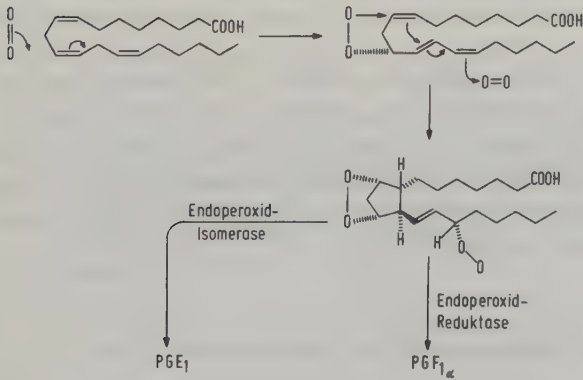


Abb. 5. Biosyntheseweg.

2.2. Methoden zur Bestimmung der Bildung von Prostaglandinen.

Derzeit sind vier Methoden zur Quantifizierung von Prostaglandinen üblich:

- 1) Messung der durch Prostaglandin hervorgerufenen Kontraktion glatter Muskulatur (91).
- 2) Die gaschromatographisch-massenspektrometrische Bestimmung (101,102) ist die genaueste Methode. Wegen des erheblichen apparativen Aufwandes ist sie bisher nur einigen Laboratorien vorbehalten.
- 3) Umwandlung von Vorläufern in Prostaglandine. Die Zellen werden mit radioaktiver DHGLS oder Arachidonsäure inkubiert. Die daraus gebildeten Prostaglandine werden aus Zellen und Wachstumsmedium extrahiert, säulenchromatographisch in die Vorläufer sowie die Prostaglandinklassen A, E und F aufgetrennt (103,104) (Abb.6) und weiter mittels Dünnschichtchromatographie gereinigt (105). Ihre Radioaktivität gilt als Maß für die gebildete Menge.
- 4) Radioimmunologische Methode (103,104). Wir haben Antikörper gegen jede der drei Prostaglandinklassen (A,E,F) hergestellt. Da diese Antikörper kreuzreagieren können, müssen die Prostaglandine vor der Messung säulenchromatographisch (s.o.) getrennt werden. Unbekannte Mengen Prostaglandin und bekannte Mengen radioaktiven Prostaglandins konkurrieren um die Bindungsstellen an dem jeweiligen Antikörper. Mit bekannten Mengen nichtradioaktiven Prostaglandins läßt sich eine Eichkurve erstellen (Abb. 7), mit deren Hilfe es möglich ist, den Prostaglandinegehalt unbekannter Proben zu ermitteln.

In vorliegender Arbeit wurden nur die Methoden 3 und 4 eingesetzt.

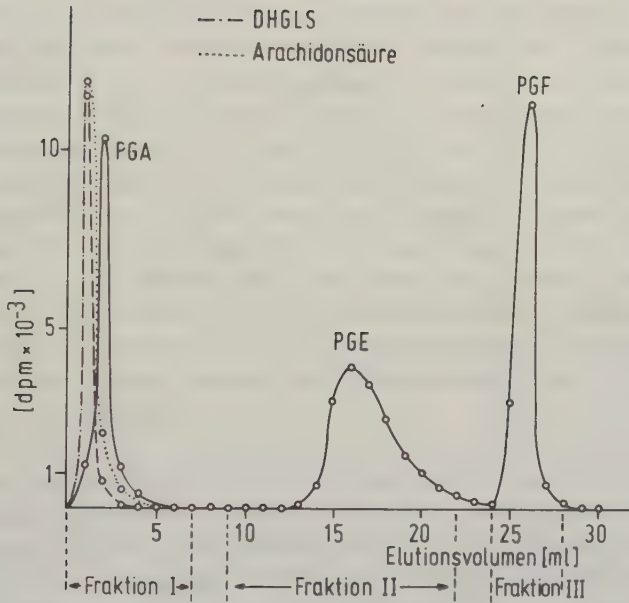


Abb. 6. Säulen-Chromatographie von Prostaglandinen und deren Vorläufer an Kieselgel. Auf eine Kieselgelsäule ($0,9 \times 1,5$ cm) wurden je $10 \text{ nMol } ^{14}\text{C-DHGLS}$, $^3\text{H-PGA}_1$, $^{14}\text{C-PGE}_1$ und $^3\text{H-PGF}_{1\alpha}$ gegeben. Die Trennbarkeit von $^{14}\text{C-Arachidonsäure}$ und $^3\text{H-PGA}_1$ wurde in einem Parallelversuch untersucht. Eluiert wurde nach der in C.V.3 beschriebenen Vorschrift.

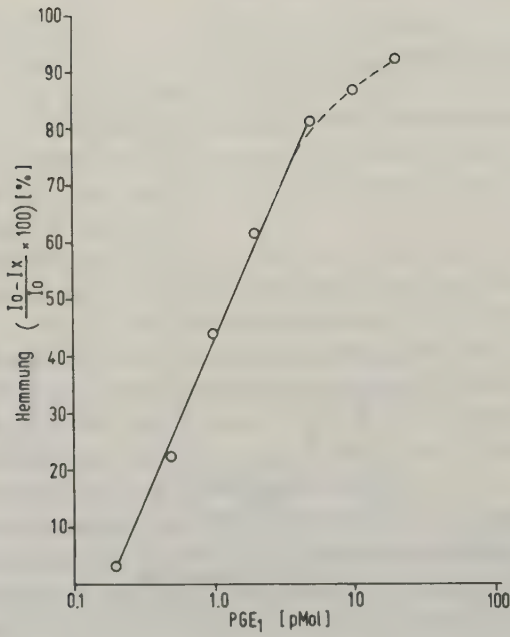


Abb. 7. Eichkurve für die radioimmunologische Bestimmung von PGE₁.

2.3. Aufnahme von Vorläuferfettsäuren in Gliomazellen.

Um die Bildung von Prostaglandinen aus radioaktiven Fettsäuren messen zu können, mußten die Inkubationsbedingungen optimiert werden. Dazu wurden Gliomazellen verschieden lange mit den radioaktiven Fettsäuren inkubiert, bevor der Radioaktivitätsgehalt der Zellen gemessen wurde. Beinahe die gesamte Radioaktivität von $1\text{-}^{14}\text{C}$ -DHGLS wird in die Zellen aufgenommen (Abb. 8, Kurve I). ^{14}C -Arachidonsäure wird mit gleicher Geschwindigkeit aufgenommen wie ^{14}C -DHGLS (Daten nicht gezeigt). Aus der Anreicherung in den Zellen kann man schließen, daß die Fettsäuren entweder aktiv transportiert werden oder nach Aufnahme unverändert oder umgewandelt gebunden werden. Wird den Zellen an Stelle von ^{14}C - ^3H -Arachidonsäure angeboten, findet man nur einen geringen Teil der Radioaktivität in den Zellen (Abb. 8, Kurve II).

Der Unterschied der mit ^{14}C - und ^3H -Fettsäuren erhaltenen Ergebnisse läßt vermuten, daß ein Großteil der Vorläufer nach Abbau zur Synthese anderer Moleküle verwendet wird. Die überwiegende Menge des ^3H wird ins Medium abgegeben. Bei Gefrier-trocknung des Mediums verflüchtigen sich 40 % des radioaktiven Materials.

Die Vorläuferfettsäuren werden nicht durch aktiven Transport, sondern durch Diffusion aufgenommen. Die Anfangsgeschwindigkeit der Aufnahme ist über einen weiten Konzentrationsbereich (0,1 - 1000 μM) dem Fick'schen Gesetz gehorchend proportional der Vorläuferkonzentration im Medium (Abb. 9). Im Falle aktiven Transports wäre eine Sättigung des Transportsystems zu erwarten gewesen (Plateau).

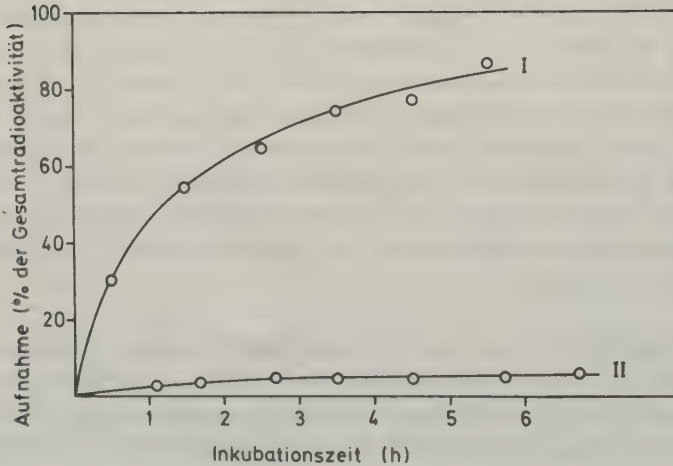


Abb. 8. Aufnahme von ^{14}C -DHGLS (Kurve I) und ^3H -Arachidonsäure (Kurve II) ($10\text{ }\mu\text{M}$, 37700 bzw. 125000 dpm) in Gliomazellen C6-BU-1 (60 bzw. 20×10^6 lebende Zellen pro Platte). Die Plastikpetrischalen ($85\text{mm } \varnothing$) enthalten 5 ml DMEM . Am Ende der Inkubationszeit wird das Medium entfernt, sodann der Zellrasen $2 \times$ mit eiskaltem DMEM gewaschen und von der Platte gekratzt. Radioaktivitätsmessung nach Zugabe von 10 ml Unisolve .

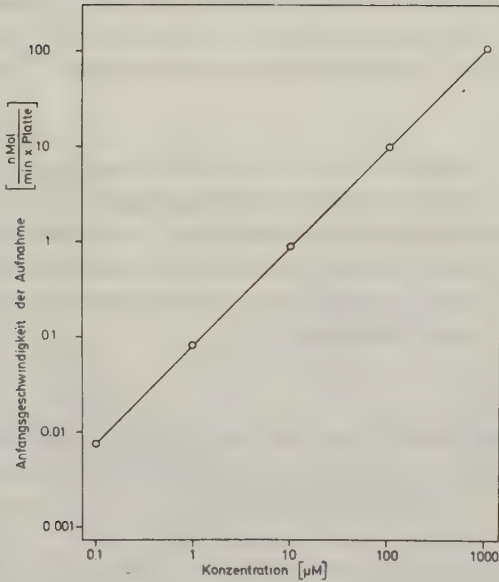


Abb. 9. Anfangsgeschwindigkeit der Aufnahme von ^{14}C -DHGLS in Gliomazellen als eine Funktion der Anfangskonzentration des Vorläufers. Kurven ähnlich zu Kurve I (Abb. 8) wurden über einen weiten Konzentrationsbereich aufgenommen. Durch den ersten Meßpunkt wurde eine Ursprungsgerade gelegt. Die Steigungen der Geraden wurden gegen die Konzentration an ^{14}C -DHGLS aufgetragen. Experimentelle Einzelheiten wie in Abb. 8, außer, daß die Platten 31×10^6 lebende Zellen enthielten.

2.4. Prostaglandinsynthese in Anwesenheit von Vorläuferfett-säuren in Gliomazellen.

Nach einstündiger Inkubation von Gliomazellen mit ^{14}C -DHGLS findet man ca. 40 % der Radioaktivität in den Zellen. Wie im Folgenden beschrieben, werden daraus meßbare Mengen ^{14}C -Prostaglandine gebildet.

Nach der Inkubation wurden die Prostaglandine aus Zellen und Medium extrahiert und durch Säulenchromatographie in die PGA-, PGE- und PGF-haltigen Fraktionen aufgetrennt. Aliquote Teile dieser Fraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie weiter untersucht. Tab. 1 enthält die R_F -Werte authentischer Prostaglandine und ihrer Vorläufer.

Tab. 1. R_F -Werte von Prostaglandinen und deren Vorläufer.

Art der Dünnschichtplatte	F _{2α}	F _{1α}	E ₂	E ₁	15- Keto- E ₂	B ₂	A ₂	A ₁	Ara-DHG chi- LS don- säure
Kieselgel G [*]	0,12	0,12	0,22	0,22	0,42	0,52	0,52	0,52	0,85 0,85
Kieselgel G + 5% AgNO ₃ ^{MM}	0,05	0,11	0,11	0,18	-	-	0,57	0,62	0,78 0,83
Kieselgel G +15% AgNO ₃ ^{MMM}	-	-	0,13	0,16	0,35	0,44	0,46	0,54	0,63 0,84

^{*} Fertigplatten 20x20 cm. ^{MM} Glasplatten mit einer Mischung von Kieselgel und AgNO₃ in Wasser beschichtet (0,25mm Schichtdicke).

^{MMM} Fertigplatten durch Besprühen mit 15%iger wässriger AgNO₃-Lösung imprägniert.

Abb. 10 zeigt die Verteilung der Radioaktivität nach Dünnschichtchromatographie der PGA-Fraktion aus dem Medium. Nur zwei Gipfel konnten identifiziert werden, nämlich DHGLS und PGA₁. Unmarkierte Referenzsubstanzen hatten die gleichen R_F -Werte.

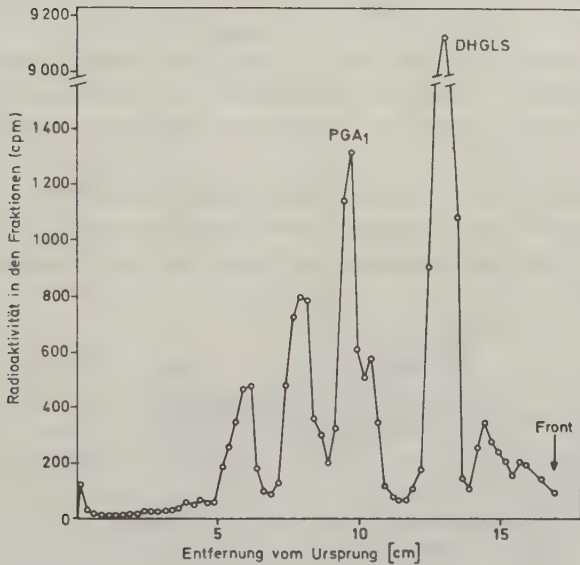


Abb. 10. "Scraper"-Diagramm der PGA-Fraktion des prostaglandin-ähnlichen Materials, das aus ^{14}C -DHGLS gebildet wurde (3×10^6 cpm, $10 \mu\text{M}$ DHGLS, 5 ml DMEM, 120×10^6 lebende Gliomazellen). Dünnschichtplatten: Fertigplatten Kieselgel G/15 % AgNO_3 . Weitere Einzelheiten siehe unter C.V.4.

Nur ein größerer Radioaktivitätsfleck erschien auf dem Dünnschichtchromatogramm der PGE-Fraktion (Abb. 11 A, Kurve I). Authentisches unmarkiertes PGE_1 lief genauso weit.

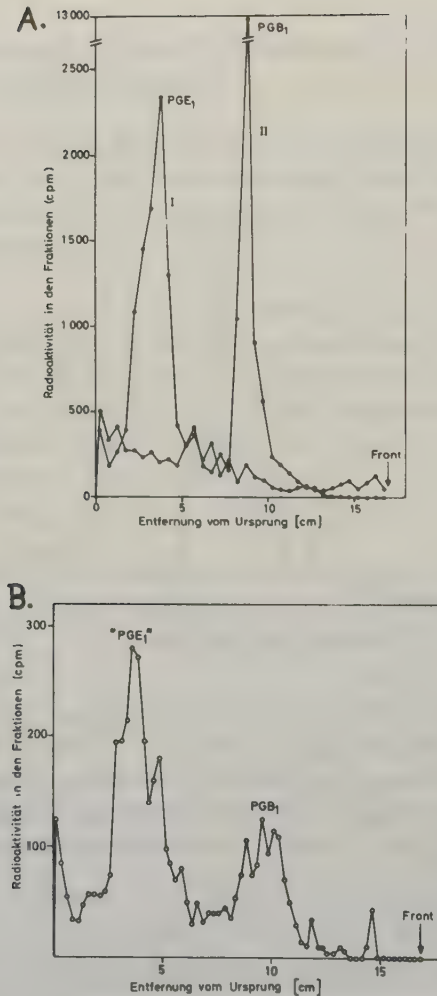


Abb. 11. "Scraper"-Diagramme. A. PGE-Fraktion des aus ¹⁴C-DHGLS gebildeten prostaglandinähnlichen Materials (Kurve I). Authentisches ¹⁴C-PGE₁, 1 h lang bei Raumtemperatur mit 0,5 M KOH in 50 % Äthanol behandelt (Kurve II). B. Dasselbe Material wie in A, Kurve I, jedoch mit KOH behandelt wie in A, Kurve II. Dünnschichtplatten: Fertigplatten Kieselgel G. Weitere Details wie in Abb.10.

Die Identität des gebildeten PGE_1 wurde bewiesen durch alkali-katalysierte Umwandlung (106) in PGB_1 (Abb. 4). Abb. 11 A, Kurve II, zeigt dies zunächst für authentisches PGE_1 . Überraschenderweise konnte das aus den Zellen isolierte Material nur teilweise in PGB_1 umgewandelt werden. Der Rest war alkali-resistent, also sicher auch kein PGE_1 (Abb. 11B).

Auch die PGF-Fraktion des extrahierten Mediums wurde untersucht (Abb. 12). Der einzige größere Radioaktivitätsfleck co-chromatographierte mit authentischem unmarkiertem $\text{PGF}_{1\alpha}$.

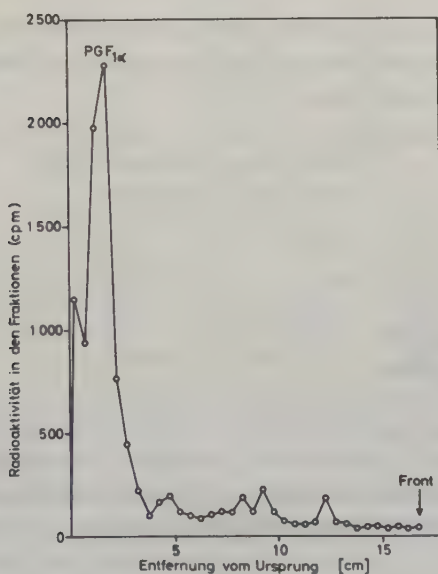


Abb. 12. "Scraper"-Diagramm der PGF-Fraktion des aus ^{14}C -DHGLS gebildeten prostaglandinähnlichen Materials. Weitere Details wie in Abb. 10.

In einigen Fällen wurde der Prostaglandingehalt der Zellen bestimmt. Da diese nur 10 % der im Medium gefundenen Prostaglandine enthielten, wurde bei allen anderen Versuchen auf Bestimmung der intrazellulären Prostaglandine verzichtet. Aus der Radioaktivität in den Prostaglandinfraktionen PGA_1 , " PGE_1 " (d.h. alkalisensitives Material + alkaliresistentes Material) und $PGF_{1\alpha}$ wurden die aus den Vorläufern pro Zeiteinheit gebildeten Prostaglandinmengen berechnet. Diese Ergebnisse wurden teilweise mit solchen verglichen, die mit dem radioimmunologischen Meßverfahren an Proben aus Parallelplatten erhalten wurden. Tabelle 2 zeigt eine gute Übereinstimmung der nach beiden Methoden erhaltenen Resultate.

Tab. 2. Vergleich der Ergebnisse, die mit dem RIA bzw. der Methode des Einbaus radioaktiver Vorläuferfettsäuren erhalten wurden.

Methode	gebildete Prostaglandine (pmol/ 10^6 Zellen/h)			Verhältnis $A_1 : "E_1" : F_{1\alpha}$
	A_1	" E_1 "	$F_{1\alpha}$	
RIA	1,4	-	1,8	0,8: - : 1
Einbau radioaktiver Vorläuferfettsäuren	1,3	1,6	1,6	0,8: 1 : 1

Offenbar spielt die Isotopenverdünnung durch schon vorhandene Fettsäuren und Prostaglandine keine Rolle.

Bei Verwendung von 3H - oder ^{14}C -Arachidonsäure erhielt man ähnliche Resultate wie mit ^{14}C -DHGLS. Dies ist für PGA_2 in Abb. 13 gezeigt. Neben den Gipfeln für 3H - oder ^{14}C -Arachidonsäure, erscheinen zwei weitere, deren R_F -Werte mit denen von

authentischem, unmarkiertem PGA_2 und 15-Keto- PGE_2 übereinstimmen.

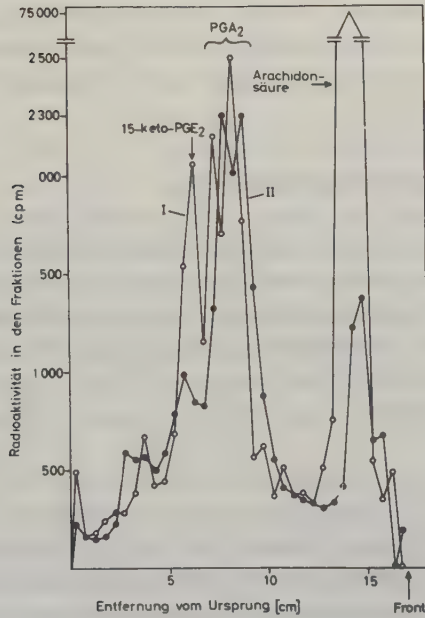


Abb. 13. "Scrapper"-Diagramm der PGA -Fraktion von prostaglandinähnlichem Material. Vorläufer: ^{14}C -Arachidonsäure (Kurve I, offene Symbole), ^3H -Arachidonsäure (Kurve II, geschlossene Symbole). Weitere Details wie in Abb. 10.

Mit keinem der bekannten Inhibitoren der Prostaglandinsynthese (107) Aspirin, Indometacin oder Flufenaminsäure konnte die Bildung der Prostaglandine in Gliomazellen gehemmt werden. Der in Abb. 2 vorgeschlagene Regelkreis setzt erhöhte Geschwindigkeit der Prostaglandinsynthese als Folge eines gesteigerten cAMP-Spiegels voraus. Deshalb wurden diese Zellen in Anwesenheit von NA oder NA + MIBX in der beschriebenen Weise mit ^{14}C -DHGLS inkubiert. Vermehrte Bildung von Prostaglandinen konnte unter diesen Bedingungen aber nicht beobachtet werden.

2.5. Beurteilung der Ergebnisse.

Alle verwendeten Vorläuferfettsäuren - radioaktiv oder nicht - wurden vor den jeweiligen Versuchen dünn-schichtchromatographisch auf Reinheit untersucht. Um Verunreinigungen durch cis-trans-Isomere feststellen zu können, wurden AgNO_3 - imprägnierte Kieselgelplatten verwendet (108). Die Reinheit aller Fettsäuren war >99 %.

In Kontrollversuchen mit Kulturmedium ohne Zellen wurde ^{14}C -DHGLS spontan verändert. Radioaktivitätsgipfel wurden auch im chromatographischen Bereich von PGA, E und F gefunden. Radioimmunologische Messungen ergaben, daß die Umwandlungsprodukte keine Prostaglandine sind. Außerdem ist das PGE-ähnliche Material nicht alkalisensitiv und daher kein PGE. Prostaglandine werden also nur in Anwesenheit von Zellen gebildet. Da sich DMEM mit Sicherheit vom Milieu in der Zelle stark unterscheidet, kann spontane intrazelluläre Bildung von Prostaglandin nicht ausgeschlossen werden, zumal die genannten Inhibitoren unwirksam waren. Wahrscheinlicher ist aber enzymatische Synthese der Prostaglandine. Die Unwirksamkeit der Hemmstoffe müßte dann z.B. durch Ausschluß aus der Zelle oder durch Unempfindlichkeit der Prostaglandinsynthetase erklärt werden. Spontane Umwandlung radioaktiver Fettsäuren im Medium dürfte

die Messung der Prostaglandinbildung nur dann stören, wenn wenig Zellen eingesetzt werden, da dann die Radioaktivität der Umwandlungsprodukte größer ist als die der co-chromatographierenden Prostaglandine. In solchen Fällen erlaubt von den hier verwendeten Methoden nur der RIA exakte Bestimmung der gebildeten Prostaglandine.

In einer früheren Arbeit (63) wurde berichtet, daß Gliomazellen C6-BU-1 bevorzugt PGE synthetisieren, nur kleinere Mengen PGA und allenfalls Spuren PGF. Die einzige für die Zellen verfügbare Quelle für Prostaglandinvorläufer waren die Lipide im Serum, welches dem Wachstumsmedium zugesetzt wird. Im hier beschriebenen Fall wurden den Zellen hohe Konzentrationen an Vorläuferfettsäuren angeboten. Überraschenderweise synthetisierten sie PGE, PGA und PGF in vergleichbaren Mengen. Möglicherweise wird bei niedrigen Substratkonzentrationen (Serum als Quelle für Vorläufer) beinahe ausschließlich PGE gebildet. Andererseits könnten PGA und PGF während der langen Inkubationszeit von 24 Stunden (63) schneller abgebaut werden als PGE.

Vermutlich ist die Bereitstellung der Vorläufer durch enzymatische Abspaltung aus der β -Stellung des Lecithins der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Prostaglandinsynthese (109). Dieser Schritt wird von Phospholipase A_2 katalysiert, deren Aktivität durch Hormone erhöht wird, die den cAMP-Spiegel in den Zellen anheben (110-112). Obwohl auch in C6-BU-1 Zellen der cAMP-Spiegel durch NA erhöht wird, findet man keine Steigerung der Prostaglandinsynthese aus freien Fettsäuren. Dies deutet darauf hin, daß nicht die Prostaglandinsynthetase, sondern - wenn überhaupt - ein davorliegender Schritt geschwindigkeitsbestimmend ist. Mit der Methode der Umwandlung radioaktiver Fettsäuren ist die hormonelle Regulation wegen der Umgehung des vermutlich geschwindigkeitsbestimmenden Schritts nicht untersuchbar. Die Methode der

Wahl wäre die Messung der aus Membranlipiden gebildeten Prostaglandine mittels RIA. Wegen der niedrigen Syntheseraten reichte hierzu bei den notwendigen kurzen Inkubationszeiten der RIA nicht aus.

3. Prostaglandinwirkung (Kurzzeiteffekte).

3.1. cAMP und Prostaglandine.

cAMP findet man im ganzen Tierreich (113) sowie in einigen Bakterien (113). Viele Peptidhormone (z.B. ACTH, LH, TSH, Oxytocin) und biogene Amine wirken möglicherweise über eine Erhöhung des cAMP-Spiegels in der Zelle (113). cAMP (114) und cGMP (115) werden als die intrazellulären Vermittler ("second messengers") extrazellulärer Hormonwirkung betrachtet. Neben diesen Hormonen bilden Prostaglandine eine eigene Substanzklasse, die ebenfalls cAMP-Spiegel beeinflussen. Sie erhöhen den cAMP-Spiegel z.B. in Lunge, Milz, Blutplättchen, Leber, Niere und Muskel und senken ihn in Fettzellen (113). Im Zusammenhang mit dieser Arbeit ist wichtig, daß Prostaglandine - vor allem PGE_1 - auch in Präparaten neuronalen Ursprungs die cAMP-Bildung stimulieren (44-46, 65, 75, 116-118).

3.2. Regulation der cAMP-Spiegel in der Zelle.

Messung intrazellulärer cAMP-Spiegel.

Die intrazelluläre cAMP Konzentration wird durch die Aktivitäten zweier entgegengesetzt wirkender Enzyme bestimmt (113). Die cAMP-Synthese aus ATP wird durch das hormonsensitive membrangebundene Enzym Adenylatcyclase katalysiert. Den Abbau des cAMP zu 5'-AMP besorgen cAMP-spezifische Phosphodiesterasen, die als Isozyme vorkommen (119, 120). Man findet sie als Exoenzyme (121, 122) und als lösliche oder membrangebundene

Endoenzyme (113). Sie sind mehr oder weniger stark hemmbar durch MIBX, Theophyllin oder Papaverin (45,113).

Wir messen cAMP mit der von uns geringfügig modifizierten Gilman'schen Isotopenverdünnungsmethode (123). Das hierfür benötigte cAMP-Bindungsprotein isolierten wir aus Rinder-muskel. Abb. 14 zeigt eine Eichgerade. I_0 (Leerwert) ist die Radioaktivität, die an das Bindungsprotein gebunden wird, wenn nur ^3H -cAMP eingesetzt wird. I_x entspricht der gebundenen Radioaktivität, wenn außerdem steigende Mengen unmarkiertes cAMP zugegen sind. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 0,5 pMol cAMP. Die Eichgerade ist linear mindestens bis zu 100 pMol cAMP.

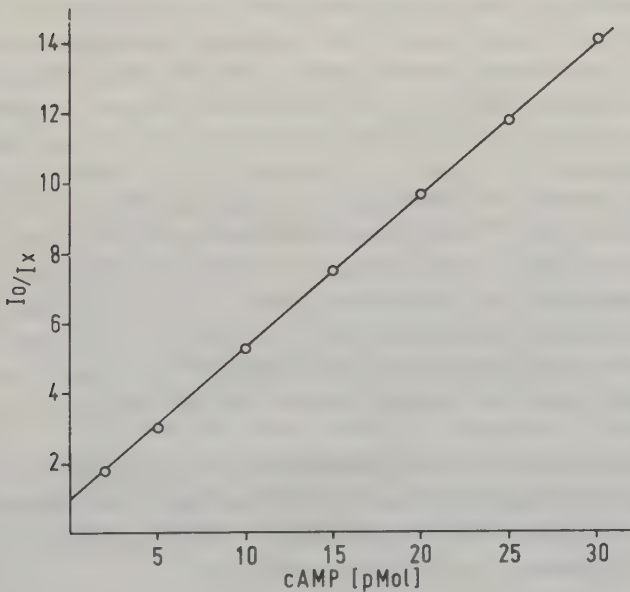


Abb. 14. Eichkurve zur Messung von cAMP.

3.3. Wirkung von Prostaglandinen auf die cAMP-Spiegel von Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen.

Wie erwähnt, erhöht PGE_1 den cAMP-Spiegel in Neuroblastoma - (44-46) und Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen (65,75). Messungen von Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit sowie über die Wirkung anderer Prostaglandine waren an den Hybridzellen noch nicht unternommen worden. Um dies nachzuholen, wurden Hybridzellen zunächst jeweils 10 min lang in Gegenwart steigender Konzentrationen PGE_1 inkubiert. Danach wurden die intrazellulären cAMP-Spiegel gemessen. Abb. 15 zeigt, daß halbmaximale Erhöhung des cAMP-Spiegels durch PGE_1 schon bei 20 nM, maximale bei 0,3 μM PGE_1 erreicht wird. Die maximalen cAMP-Spiegel schwanken von Experiment zu Experiment gelegentlich sehr stark (200-2500 pMol/mg Protein). Meistens wurden Werte um 1000 pMol/mg Protein erreicht, was bei Grundspiegeln von 10-30 pMol/mg Protein einer 30 - 100fachen Steigerung entspricht. In größerem Zusammenhang werden Erklärungsmöglichkeiten diskutiert (Kapitel B.V.3.) Um den zeitlichen Verlauf der Wirkung von PGE_1 auf die Hybridzellen kennenzulernen, wurden sie unterschiedlich lange bei konstanter PGE_1 -Konzentration inkubiert. Maximale cAMP-Spiegel werden zwischen 20 und 30 min erreicht (Abb. 16). Überraschenderweise nahm in diesem Versuch der cAMP-Spiegel während einer Stunde nicht ab. Bei anderen Versuchen war der cAMP-Spiegel nach dieser Zeit schon wieder teilweise abgesunken. Wir finden hier einen ersten Hinweis, daß die Phosphodiesterase-Aktivität regulierbar ist. Wir kommen später auf dieses Problem zurück (Kapitel B.I.4.).

Weiterhin wollten wir die Spezifität der Prostaglandinrezeptoren auf der Hybridzelle kennenlernen. Dazu wurden die Zellen 10 min lang mit verschiedenen Prostaglandinen unter zwei verschiedenen Bedingungen inkubiert.

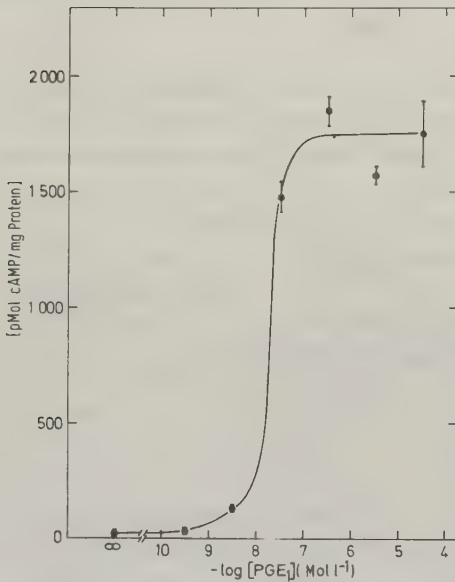


Abb. 15. Der intrazelluläre cAMP-Spiegel in Hybridzellen 108CC15 in Abhängigkeit von der PGE_1 -Konzentration im Medium. Ersatz des Wachstums- durch Inkubationsmedium 3 h vor Inkubationsbeginn. Nähere Angaben über die beiden Medien in den Kapiteln C.III.2 und C.IV.2. Inkubationszeit 10 min. Standardabweichung mit Mittelwert aus 3 Parallelinkubationen (gilt auch für alle weiteren Versuche). $1,8 \times 10^6$ lebende Zellen pro Platte, Passage 7, Lebensfähigkeit 99 %. Bei diesem und bei allen weiteren Versuchen war der Plattendurchmesser 85 mm.

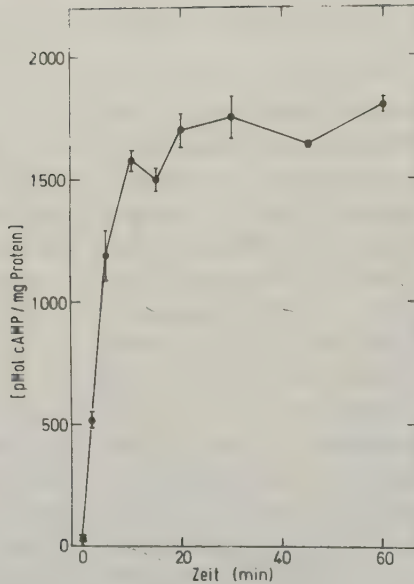


Abb. 16. Abhängigkeit des intrazellulären cAMP-Spiegels von der Zeit der Inkubation mit PGE_1 ($3 \mu\text{M}$). Hybridzellen 108CC15. $4,3 \times 10^6$ lebende Zellen pro Platte, Passage 8 Lebensfähigkeit 98 %. Sonst wie Abb. 15.

Methode 1 (Standardmethode):

- Entfernen des Wachstumsmediums;
- einmaliges Waschen der Zellen mit 5 ml Inkubationsmedium;
- Zugabe von 5 ml Inkubationsmedium;
- sofortiges Zupipettieren des Prostaglandins, 10 min Inkubation, cAMP-Bestimmung.

Methode 2:

- c) wie bei Methode 1;
- Zellen drei Stunden mit Inkubationsmedium im Inkubator

stehen lassen, dann erst Zupipettieren des Hormons, 10 min Inkubation und cAMP-Bestimmung.

Tab. 3. Spezifität der Prostaglandinrezeptoren von Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen unter zwei verschiedenen Inkubationsbedingungen (siehe Text).

Art des Prostaglandins	% des maximalen cAMP-Spiegels		
	Inkubations- methode 1 (Standardmethode) Experiment I	Inkubationsmethode 2	
		Experiment I	Experiment II
PGE ₁	100,0 (1070)*	100,0 (1730)*	100,0 (1200)*
PGE ₂	33,2	91,7	89,2
PGA ₁	7,0	42,6	53,8
PGA ₂	3,9	4,2	5,2
PGF _{1α}	4,1	4,0	6,5
PGF _{2α}	3,8	3,6	5,3
-	2,8	1,7	1,1

Hybridzellen 108CC15, Passage 8 (Experiment I) bzw. 7 (Experiment II), 3,3 bzw. $2,2 \times 10^6$ lebende Zellen pro Platte, 99 bzw. 90 % Lebensfähigkeit. Konzentration der Prostaglandine 3 μ M.

* In der Klammer sind die 100 % entsprechenden Absolutwerte angegeben (pMol cAMP/mg Protein).

Wie Tab. 3 zeigt, ist die Erhöhung des cAMP-Spiegels unter beiden Inkubationsbedingungen am größten, wenn PGE₁ zugegen ist. Wird nach Methode 1 inkubiert, so findet man dieselbe Abstufung der Wirksamkeit der Prostaglandine wie bei Neuroblastomazellen (Experiment II(44)). PGE₂ besitzt nur ca. 30 % der Wirksamkeit von PGE₁. Alle anderen Prostaglandine liegen unter 10 (PGA₁) oder gar unter 5 % (PGA₂, PGF_{1α}, PGF_{2α}).

Bei Inkubation nach Methode 2 ändert sich diese Abstufung beträchtlich. So stimuliert PGE_2 auf rund 90 % und PGA_1 erstaunlicherweise auf rund 40 (Experiment I) bzw. 50 % (Experiment II) der durch PGE_1 erreichten Werte. Bei den übrigen Prostaglandinen (PGA_2 , $\text{PGF}_{1\alpha}$, $\text{PGF}_{2\alpha}$) ist kein Einfluß der Inkubationsmethoden erkennbar.

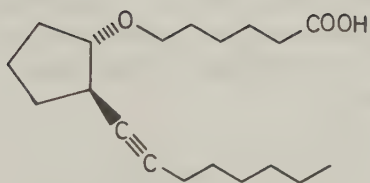
Hier zeichnet sich schon ab, daß die Vorbehandlung der Zellen und die Inkubationsbedingungen großen Einfluß auf die Ergebnisse haben können. Wir werden dies in einem eigenen Kapitel besprechen (Kapitel B.IV). Die Ursachen für die Änderung der Spezifität der Prostaglandinrezeptoren (Tab. 3) sind unbekannt. Hypothesen hierzu sind wohlfeil.

3.4. Prostaglandin - Antagonisten.

Inzwischen sind viele Verbindungen bekannt geworden, die die Wirkung von Prostaglandinen hemmen oder nachahmen (124). Zu diesen gehören eine Reihe von 7- Oxa- oder 5-Oxaprostaglandinen, bei denen eine CH_2 -Gruppe der Prostaglandine durch Sauerstoff ersetzt ist. Sie wirken als Agonisten, Antagonisten oder beides.

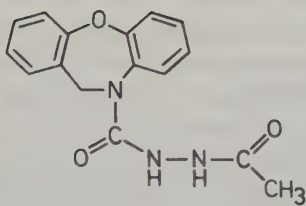
7-OPS (Abb. 17A) wirkt vor allem als Antagonist von PGE (124). Ein häufig verwendeter PGE-Antagonist ist auch das Dibenzoxazepin-Derivat SC 19220 (125,126) (Abb. 17B).

Es wurde auch angenommen, daß Morphin ein PGE-Antagonist sei, da es die durch PGE hervorgerufene Kontraktion der glatten Muskulatur des Dünndarms verhindert (125-130). Über die Wirkungen des Morphins wird in den Kapiteln B.III. und B.V. berichtet.



7-OPS

Abb. 17A.



SC 19220

Abb. 17B.

3.5. Wirkung der Prostaglandin-Antagonisten 7-OPS und SC 19220 auf Neuroblastomazellen.

Läßt sich die Prostaglandinwirkung auf Neuroblastomazellen durch 7-OPS und SC 19220 hemmen? Neben der Beantwortung dieser Frage hatte die Untersuchung noch den Zweck, ein Affinitätsmolekül zur Reinigung von Prostaglandinrezeptoren zu finden, das stabiler ist als PGE_1 .

7-OPS und PGE_1

Die Neuroblastomazellen wurden in An- oder Abwesenheit von PGE_1 oder des Phosphodiesterase-Inhibitors MIBX bei hohen und niederen Zelldichten mit steigenden 7-OPS-Konzentrationen inkubiert. Dann wurde sowohl in Zellen als auch im Inkubationsmedium der cAMP-Gehalt bestimmt. Das Ergebnis ist in Abb. 18 dargestellt. Die Kurven mit den offenen Symbolen geben jeweils den cAMP-Gehalt in den Zellen, die mit den geschlossenen Symbolen den gesamten cAMP-Gehalt von Medium und Zellen an. Sie verlaufen parallel. In Abwesenheit von PGE_1 erhöht 7-OPS bei Konzentrationen größer als micromolar den cAMP-Spiegel sowohl bei niederen (Abb. 18A, Kurven III und IV), als auch bei hohen Zelldichten (Abb. 18C, Kurven I und II), d.h. es wirkt ähnlich wie PGE_1 . Dieser Effekt wird deutlicher, wenn der Abbau des cAMP durch MIBX verhindert wird. Dies gilt wieder für niedere (Abb. 18B, Kurven I und II) wie für hohe Zelldichten (Abb. 18D, Kurven III und IV). Ist zusätzlich zu 7-OPS noch PGE_1 in der Inkubation, dann wird der stimulierende Effekt des PGE_1 durch 7-OPS in Konzentrationen kleiner als micromolar teilweise gehemmt. Dieser Effekt ist bei hohen Zelldichten viel deutlicher (Abb. 18D, Kurven I und II) als bei niedrigen (Abb. 18A, Kurven I und II). Mit höheren Konzentrationen an 7-OPS jedoch nimmt dieser inhibitorische Effekt bei hohen Zelldichten ständig ab (Abb. 18D, Kurven I und II), bis er bei einer Konzentration von 30 μM völlig verschwunden ist.

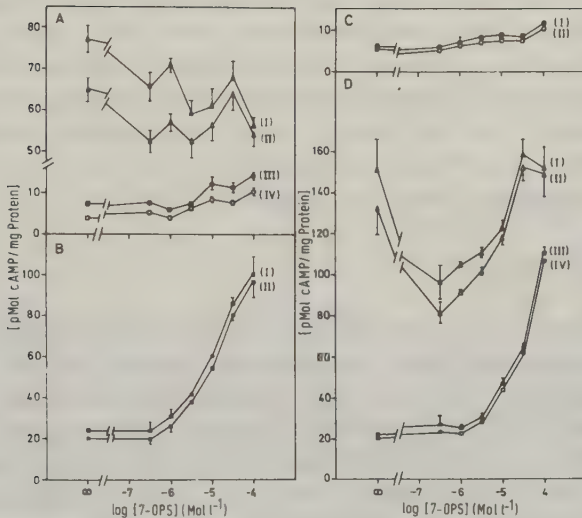


Abb.18. Der Einfluß von 7-OPS auf die cAMP-Spiegel von Neuroblastomazellen N4TG3 in An- und Abwesenheit von PGE_1 und MIBX. Inkubationszeit 10₂min. A und B: Niedere Zelldichte: $0,6 \times 10^5$ Zellen/cm². C und D: Hohe Zelldichte: $2,5 \times 10^5$ Zellen/cm². Konzentration von PGE_1 3 μM , von MIBX 500 μM .

(A) Kurve I: Gesamte cAMP Menge (Zellen + Medium) nach Stimulation mit PGE_1 , Kurve II: cAMP in den Zellen nach Stimulation mit PGE_1 ; Kurve III: Gesamte cAMP-Menge ohne Stimulation mit PGE_1 ; Kurve IV: cAMP in den Zellen, keine Stimulation mit PGE_1 .

(B) Einfluß von MIBX; Kurve I: Gesamte cAMP-Menge; Kurve II: cAMP in den Zellen.

(C) Kein PGE_1 , kein MIBX; Kurve I: Gesamte cAMP-Menge; Kurve II: cAMP in den Zellen.

(D) Kurve I: Gesamte cAMP-Menge nach Stimulation mit PGE_1 ; Kurve II: cAMP in den Zellen nach Stimulation mit PGE_1 ; Kurve III: Gesamte cAMP-Menge, Einfluß von MIBX; Kurve IV: cAMP in den Zellen, Einfluß von MIBX. PGE_1 und MIBX zusammen inkubiert ergeben folgende cAMP-Spiegel: Niedere Zelldichte: Gesamte cAMP-Menge 2460; Zellen: 2230 pMol/mg Protein; hohe Zelldichte: Gesamte cAMP-Menge 3140; Zellen: 2950.

In Übereinstimmung mit Kantor et al. (131) und im Gegensatz zu anderen Berichten (124), finden wir also, daß 7-OPS kein reiner Antagonist ohne agonistische Eigenschaften ist. Am bemerkenswertesten ist das Verschwinden der Hemmung der PGE_1 -Wirkung bei hohen Konzentrationen von 7-OPS. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß der Prostaglandinrezeptor mindestens zwei verschiedene Bindungsstellen für prostaglandinartige Substanzen enthält und daß er evtl. zwei verschiedene Konformationen annehmen kann. Ähnlich biphasisches Verhalten wurde bei Morphinrezeptoren beobachtet (Kapitel B.III.1.2.).

SC 19220 und PGE_1

Im Gegensatz zu 7-OPS hat SC 19220 bei keiner der verwendeten Konzentrationen einen nennenswerten Effekt auf die cAMP-Spiegel, weder bei niederen (Abb. 19A,B), noch bei hohen Zelldichten (Abb. 19C,D), weder in der Abwesenheit von PGE_1 oder MIBX (Abb. 19A und C, Kurven III und IV), noch in deren Gegenwart (Abb. 19A-D, Kurven I und II). Neulich wurde ein anderes Beispiel für die Unwirksamkeit von SC 19220 bekannt (132).

Die beobachtete Abgabe von cAMP ins Medium ist neben der Regulation der enzymatischen Aktivität von Adenylatcyclase und Phosphodiesterase eine weitere Möglichkeit zur Regulation der cAMP-Spiegel in der Zelle. Daneben ist nicht auszuschließen, daß cAMP ähnlich wie bei Schleimpilzen als Informationsüberträger zwischen benachbarten Zellen dient (122). Die Tatsache, daß man cyclische Nucleotide im Serum und im Urin findet, weist auf die Abgabe der Nucleotide aus lebenden Zellen hin (133). Energieabhängige Ausscheidung von cAMP aus Gliomazellen wurde inzwischen nachgewiesen (134).

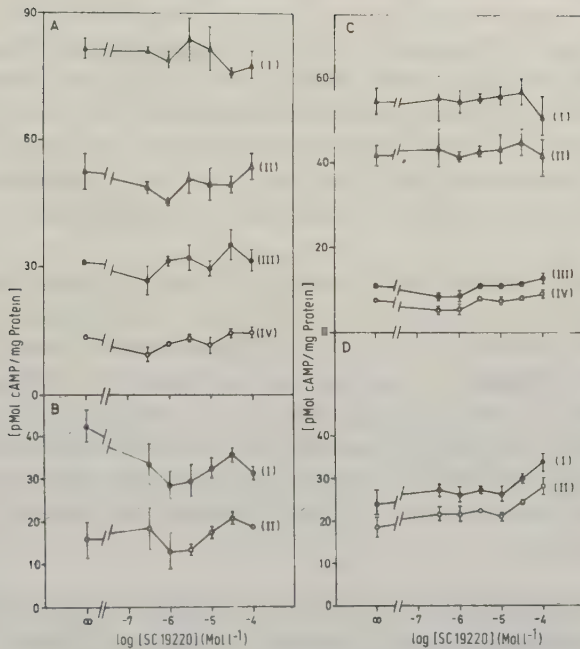


Abb.19. Einfluß verschiedener Konzentrationen von SC 19220 auf die cAMP-Spiegel in Neuroblastomazellen N4TG3 in An- und Abwesenheit von PGE_1 und MIBX. Konzentrationen von PGE_1 und MIBX wie in Abb. 18. Inkubationszeit 10 min. A,B: Niedere Zelldichte: $1,1 \times 10^5$ Zellen/cm². C,D: Hohe Zelldichte $2,1 \times 10^5$ Zellen/cm². Bezeichnung der Kurven A und B und Kurven I und II in C wie in Abb. 18. (C), Kurve III: Gesamte cAMP-Menge, keine Stimulation mit PGE_1 ; Kurve IV: cAMP in den Zellen, keine Stimulation mit PGE_1 . (D), Kurve I: Gesamte cAMP-Menge, Einfluß von MIBX; Kurve II: cAMP in den Zellen, Einfluß von MIBX. Inkubation von $PGE_1 + MIBX$ ergibt folgende cAMP-Spiegel: Niedere Zelldichte: Gesamte cAMP-Menge 2300; Zellen: 2060 pMol/mg Protein; hohe Zelldichte: Gesamte cAMP-Menge: 1820; Zellen 1650.

4. Prostaglandinwirkung (Langzeiteffekte).

Das in Abb. 2 dargestellte Modell einer schwingkreisartigen Kopplung zwischen Neuron und Gliazelle schließt auch Dämpfungsglieder ein. Ein mögliches Dämpfungsglied ist die cAMP-Phosphodiesterase, deren Aktivität in anderen Systemen cAMP-abhängig erhöht wird (84, 135, 136). Es war zu vermuten, daß dies auch in den Hybridzellen der Fall sein würde.

Um dies zu untersuchen, wurden Hybridzellen unterschiedlich lange mit PGE_1 vorinkubiert. Am Ende der Vorinkubationszeit wurde das Medium entfernt, der Zellrasen gewaschen und 10 min mit PGE_1 inkubiert (Hauptinkubation), bevor der intrazelluläre cAMP-Gehalt gemessen wurde. Der durch PGE_1 während der Hauptinkubation verursachte Anstieg des cAMP-Spiegels wird mit steigender Vorinkubationszeit geringer (Abb. 20). Nach 3 Stunden Vorinkubation mit PGE_1 sprechen die Zellen kaum noch auf PGE_1 an.

Wie lange dauert es, bis die Zellen nach Entzug des PGE_1 wieder mit dem normalen starken Anstieg des cAMP-Spiegels in Gegenwart von PGE_1 reagieren? Zur Beantwortung dieser Frage wurde 15 h mit PGE_1 vorinkubiert, das Wachstumsmedium gegen PGE_1 - freies Inkubationsmedium ausgetauscht und nach Ablauf verschiedener Zeitspannen 10 min mit PGE_1 inkubiert, um nachzuprüfen, ob die Zellen wieder in der üblichen Weise stimulierbar sind. Nach 6 h scheinen die Zellen ihre "Vorgeschichte vergessen" zu haben. Sie antworten auf die Gegenwart von PGE_1 mit der üblichen starken Erhöhung ihres cAMP-Spiegels (Abb. 21).

Beruhet das Ausbleiben der Antwort auf PGE_1 in vorinkubierten Zellen auf einer Verringerung der Adenylatcyclase- oder einem Anstieg der cAMP-Phosphodiesterase-Aktivität? Um diese Fragen zu klären, wurden Zellen 15 h mit PGE_1 behandelt und - wie oben

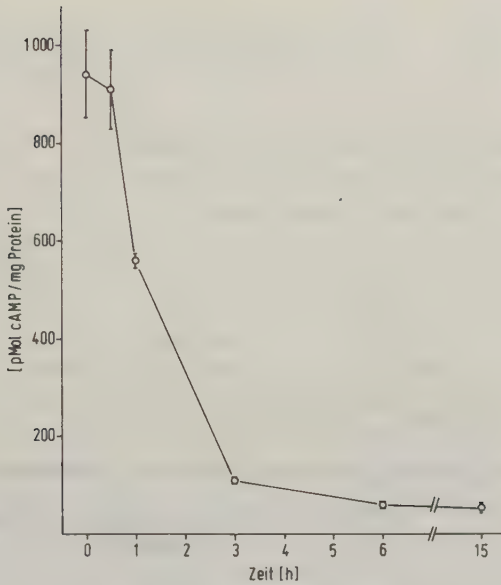


Abb. 20. Langzeitinkubation von Hybridzellen 108CC15 mit PGE_1 . $0,9 \times 10^6$ lebende Zellen pro Platte, Passage 12; Lebensfähigkeit 91 %. Konzentration von PGE_1 während der Langzeitinkubation: $1 \mu\text{M}$ PGE_1 in Wachstumsmedium, während der Hauptinkubation: $3 \mu\text{M}$ PGE_1 in Inkubationsmedium. Nähere Angaben über die beiden Medien siehe Abb. 15.

beschrieben - erneut mit PGE_1 stimuliert (10 min), diesmal jedoch in Gegenwart des Phosphodiesterase - Inhibitors MIBX. In Tab. 4 fällt auf, daß die Kontrollwerte stark erhöht sind (42 bzw. 46 p Mol/mg Protein). Überraschenderweise verursacht Zugabe von MIBX bei unbehandelten Zellen keine Erhöhung des cAMP-Spiegels.

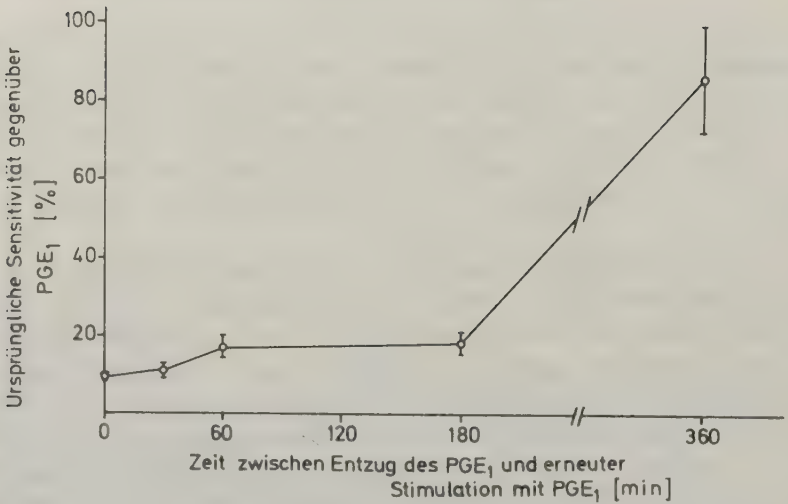


Abb. 21. Der Verlust der Stimulierbarkeit durch PGE₁ nach Langzeitinkubation (15 h) mit PGE₁ ist reversibel. Hybridzellen 108CC15, Passage 8; $1,8 \times 10^6$ lebende Zellen pro Platte; Lebensfähigkeit 97 %. PGE₁-Konzentrationen und Medien wie in Abb. 20.

Dies könnte bedeuten, daß Phosphodiesterase-Aktivität entweder nicht vorhanden oder, falls vorhanden, nicht hemmbar ist. Der in Gegenwart von PGE₁ sehr hohe cAMP-Spiegel wird durch Zusatz von MIBX noch erheblich gesteigert. Während bei hohem cAMP-Spiegel MIBX die Gegenwart einer Phosphodiesterase verrät, zeigt es bei niedriger cAMP-Konzentration keine solche Aktivität an. Man kann daraus schließen, daß die Zellen eine Phosphodiesterase enthalten, welche einen hohen K_M -Wert für cAMP besitzt. Die Gegenwart macht den hohen Kontrollwert bei den unbehandelten Zellen verständlich.

Tab. 4. MIBX verhindert den Verlust der PGE_1 -Stimulierbarkeit nach Langzeitinkubation mit PGE_1 .

Zusatz (μM)	unbehandelte Zellen	Zellen 15 h mit PGE_1 ($1\mu\text{M}$) vorbehandelt (pMol cAMP/mg Protein)
Kontrolle	42	46
MIBX (500)	46 ± 6	230 ± 16
PGE_1 (3)	1520 ± 160	264 ± 21
PGE_1 (3) + MIBX (500)	4330 ± 380	2570 ± 80

Hybridzellen 108CC15, Passage 21, $3,3 \times 10^6$ lebende Zellen pro
Platte, Lebensfähigkeit 97 %. Weitere Angaben siehe Abb. 20.

Interessant ist nun, daß bei PGE_1 -vorbehandelten Zellen MIBX den cAMP-Spiegel auch in Abwesenheit von PGE_1 erhöht. Daraus läßt sich auf eine MIBX-hemmbar Phosphodiesterase mit niedrigem K_M -Wert schließen. Trotz Abbau von cAMP ist der Kontrollwert bei vorbehandelten Zellen so hoch wie bei nicht vorbehandelten. Dies ist aber nur möglich, wenn bei der Vorbehandlung außer der Aktivität der Phosphodiesterase auch die der Adenylatcyclase erhöht wurde.

Wie bereits in Abb. 20 und 21 gezeigt, sind PGE_1 -vorbehandelte Zellen durch PGE_1 kaum mehr stimulierbar. Ist aber MIBX zugegen, dann läßt sich der cAMP-Spiegel durch PGE_1 wieder stark erhöhen. Dies beweist, daß Vorinkubation der Zellen mit PGE_1 die Bildung einer Phosphodiesterase mit niedrigem K_M -Wert auslöst. Ein solches Phänomen ist bereits an anderen Zellen beobachtet worden (135-137). Ebenfalls in Übereinstimmung mit (137) ist die Beobachtung, daß bei Stimulation durch NA oder AcCh in PGE_1 -vorbehandelten Zellen dieselben cGMP-Spiegel

erreicht werden wie in unbehandelten (138). Wie in (137) scheint die neugebildete Phosphodiesterase cAMP-spezifisch zu sein. In vorbehandelten Zellen werden in Gegenwart von PGE_1 + MIBX kleinere cAMP-Spiegel erreicht als in unbehandelten Kontrollzellen. Die Erklärung dieses Phänomens durch erniedrigte Adenylatcyclase-Aktivität ist wenig wahrscheinlich, da Anzeichen für das Gegenteil (siehe oben) vorliegen. Andere Erklärungsmöglichkeiten sind: Auftreten einer MIBX-insensitiven Phosphodiesterase, Erniedrigung der Zahl der Prostaglandinrezeptoren oder Verringerung der Kopplung zwischen diesen Rezeptoren und der Adenylatcyclase in den behandelten Zellen. Hier können nur direkte Messungen der Enzymaktivitäten und Rezeptordichten weiterhelfen.

Hinweise auf Beteiligung von Proteinbiosynthese bei der Entwicklung erhöhter Phosphodiesterase-Aktivität in vorbehandelten Zellen erhielten wir mit Cycloheximid, einem Hemmer der cytoplasmatischen Proteinbiosynthese.

Bemerkenswert ist, daß vorbehandelte Zellen eine um eine Zehnerpotenz niedrigere Empfindlichkeit gegenüber PGE_1 besitzen als nicht vorbehandelte (Abb. 22). (EC_{50} 30 bzw. 300 nM). Wie in Tab. 4 zeigt sich auch hier bei den vorbehandelten Zellen wieder die erniedrigte maximale Stimulierbarkeit durch PGE_1 .

Es kann keinesfalls als gesichert angesehen werden, daß die beobachteten Langzeitwirkungen des PGE_1 durch cAMP mediiert werden. Wenn auch unwahrscheinlich, könnte PGE_1 unabhängig voneinander den cAMP-Spiegel erhöhen und die Steigerung der Phosphodiesterase-Aktivität einleiten.

Übertragen auf die Vorgänge im Gehirn und gleichzeitig als Antwort auf unsere eingangs des Abschnitts aufgeworfene Frage bedeuten die eben dargestellten Untersuchungen, daß es tatsächlich ein selbstregulierendes System PGE_1 -cAMP-Phosphodiesterase geben könnte.

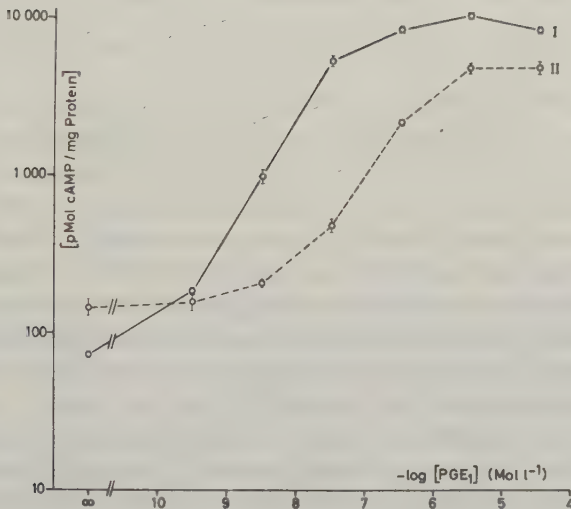


Abb. 22. Erhöhung der cAMP-Spiegel in Hybridzellen 108CC15 durch steigende Konzentrationen von PGE₁. In jeder Inkubation 500 μ M MIBX zugegen. Inkubationszeit 10 min. Kurve I: nicht vorbehandelte Zellen; Kurve II: 15 h mit PGE₁ vorbehandelte Zellen. PGE₁-Konzentrationen und weitere Details wie in Abb. 20. $2,4 \times 10^6$ lebende Zellen pro Platte, Passage 10, Lebensfähigkeit 97 %.

Abschließend sei erwähnt, daß inzwischen analoge Beobachtungen an menschlichen Synoviocyten bei Langzeiteinwirkung von Prostaglandin gemacht wurden (139).

II. Adenosin und seine Derivate.

1. Kurzzeiteffekte mit Adenosin und seinen Derivaten.

Es gibt Anzeichen dafür, daß Adenosin und seine Derivate ATP, ADP oder AMP in bestimmten Systemen inhibitorische Neurotransmitter sind (140-142). Es wurde gezeigt, daß Adenosin die cAMP-Spiegel in neuronalem und nichtneuronalem Gewebe beeinflussen kann. Adenosin erhöht die cAMP-Spiegel in Gehirnschnitten (143-148), Neuroblastoma- (142, 149) und Astrocytomazellen (150) und in Blutplättchen (151, 152). Im Gegensatz dazu verhindert Adenosin die Erhöhung des cAMP-Spiegels durch Catecholamine in Fettzellen (153, 154). Sattin und Rall beobachteten ursprünglich an Gehirnschnitten, daß außer Adenosin auch AMP, ADP und ATP, nicht jedoch Adenin, den cAMP-Spiegel erhöhen (145). Blume und Foster fanden in Neuroblastomazellen (142) eine entsprechende Erhöhung nur mit Adenosin, 2-Chloroadenosin und AMP. Die Erhöhung durch AMP war so gering, daß sie seine Wirkung auf eine teilweise Umwandlung zu Adenosin zurückführten.

Wir vermuteten, daß die genannten Verbindungen auch in den Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen den cAMP-Spiegel erhöhen könnten. Dazu wurden die Zellen mit Adenin und den oben genannten Derivaten in An- und Abwesenheit von MIBX inkubiert (Tab. 5).

Während sich der cAMP-Spiegel bei $1\mu\text{M}$ Adenosin nur leicht erhöht, steigt er bei $100\mu\text{M}$ auf das 7-fache (Versuch I). Die Höhe der Stimulation durch PGE_1 (36-fach) wird also nicht erreicht (Versuch I). In Gegenwart eines Phosphodiesterase-Hemmers (Versuch II) ist der Adenosin-Effekt viel stärker ausgeprägt. Außer Adenosin erhöhen auch AMP, ADP und ATP den intrazellulären cAMP-Spiegel beträchtlich (Versuch III). Adenin ($100\mu\text{M}$) dagegen ist unwirksam.

Tab. 5. Adenosin, AMP, ADP und ATP erhöhen den intrazellulären cAMP-Spiegel in Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen.

Versuch I		Versuch II		Versuch III	
Zusatz (μM)	cAMP (pMol/mg Protein)	Zusatz (μM)	cAMP (pMol/mg Protein)	Zusatz (μM)	cAMP (pMol/mg Protein)
Kontrolle	42	Kontrolle	14	Kontrolle	17 $\pm$ 2
PGE ₁ (3)	1520 $\pm$ 160	MIBX (500)	39 $\pm$ 1	PGE ₁ (3)	671 $\pm$ 55
Adenosin (1)	59 $\pm$ 2	PGE ₁ (3)	1370 $\pm$ 50	Adenosin(100)	276 $\pm$ 24
Adenosin(10)	152 $\pm$ 7	PGE ₁ +MIBX	6800 $\pm$ 460	AMP (100)	250 $\pm$ 22
Adenosin(100)	280 $\pm$ 36	Adenosin(100)	184 $\pm$ 23	ADP (100)	207 $\pm$ 15
		Adenosin+ MIBX	938 $\pm$ 12	ATP (100)	165 $\pm$ 18
				Adenin (100)	22 $\pm$ 3

Inkubationszeit 10 min. Hybridzellen 108CC15, Passagen: 21 (I), 13 (II), 17 (III). Lebende Zellen pro Platte (und Lebensfähigkeit): $3,3 \times 10^6$ (97%, I), $3,2 \times 10^6$ (90%, II), $2,4 \times 10^6$ (96%, III).

Geklärt werden müssen folgende Fragen:

- 1) Wirken die vier Substanzen Adenosin, AMP, ADP und ATP über denselben Rezeptor?
- 2) Wirken die Verbindungen AMP, ADP und ATP erst nach Umwandlung in Adenosin?
- 3) Wirken die Substanzen über (einen) purinerge(n) Rezeptor(en) oder indirekt nach Aufnahme in die Zelle?

Verschiedene Arbeiten aus anderen Labors (142-148) deuten darauf hin, daß es tatsächlich einen membrangebundenen Adenosin-Rezeptor gibt. PGE₁- und Adenosin-Rezeptor sind wahrscheinlich verschiedene Proteine (142). Gegen die Wirkung von

Adenosin nach Aufnahme in die Zelle spricht, daß der Adenosineffekt größer ist, wenn die Aufnahme von Adenosin durch Dipyridamol gehemmt wird (146). Da Adenosin den cAMP-Spiegel sowohl in Astrocytoma - als auch in Neuroblastomazellen bzw. Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen erhöht, besitzt Adenosin möglicherweise keine Spezifität für Glia- oder Nervenzellen. Die in Gehirnschnitten beobachteten Adenosineffekte könnten deshalb aus einem glialen und einem neuronalen Anteil zusammengesetzt sein.

2. Langzeiteffekte mit Adenosin.

Sowohl PGE_1 als auch Adenosin erhöhen den intrazellulären cAMP-Spiegel. Wie wir in Kapitel B.I.4. gezeigt haben, verlieren die Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen nach Langzeitinkubation mit PGE_1 fast vollständig die Fähigkeit, auf erneute Stimulation mit PGE_1 hin den cAMP-Spiegel zu erhöhen. Beobachtet man analog dazu auch Langzeiteffekte mit Adenosin?

Dazu wurde den Zellen für 15 h 100 μM Adenosin ins Wachstumsmedium gegeben. Als Kontrollen dienten Zellen, die entweder keine Zusätze im Wachstumsmedium hatten oder die während dieser Zeit mit 1 μM PGE_1 vorinkubiert wurden. Am Ende der Vorinkubationszeit wurde bei allen Zellen das Medium gewechselt. Dann wurde sofort 10 min lang mit verschiedenen Zusätzen inkubiert. Die Messung der intrazellulären cAMP-Spiegel gab das in Tabelle 6 gezeigte Ergebnis.

Tab. 6. Langzeitinkubation von Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen mit PGE_1 und Adenosin.

Zusätze (μM)	nicht vorbehandelte Zellen	mit PGE_1 vorbehandelte Zellen (1 μM PGE_1 für 15h)	mit Adenosin vorbehandelte Zellen (100 μM Adenosin für 15 h)
Kontrolle	14	30 $\pm$ 2	14 $\pm$ 1
MIBX (500)	39 $\pm$ 1	90 $\pm$ 13	53 $\pm$ 4
PGE_1 (3)	1370 $\pm$ 50	261 $\pm$ 26	1240 $\pm$ 100
PGE_1 +MIBX	6800 $\pm$ 460	3560 $\pm$ 310	3370 $\pm$ 260
Adenosin (100)	184 $\pm$ 23	58 $\pm$ 7	291 $\pm$ 23
Adenosin+MIBX	938 $\pm$ 12	648 $\pm$ 30	882 $\pm$ 27

Weitere Details siehe Abb. 20. Hybridzellen 108CC15, Passage 13, 3,2x10⁶ lebende Zellen pro Platte, Lebensfähigkeit 90 %.

Wie schon in Tab. 4 gezeigt, verlieren die PGE_1 -vorbehandelten Zellen weitgehend ihre Fähigkeit, auf PGE_1 mit einer starken Erhöhung des cAMP-Spiegels zu reagieren. Interessanterweise verlieren sie auch ihre Fähigkeit in derselben Weise auf Adenosin anzusprechen. Dies weist darauf hin, daß es wahrscheinlich nur einen cAMP-"pool" gibt. Denn unabhängig von der die Adenylatcyclase aktivierenden Substanz kann das gebildete cAMP durch dieselbe Phosphodiesterase abgebaut werden. Überraschenderweise verlieren mit Adenosin vorbehandelte Zellen ihre Stimulierbarkeit durch PGE_1 oder Adenosin nicht. Der Grund hierfür könnte darin liegen, daß Adenosin entweder extrazellulär abgebaut oder in die Zelle aufgenommen wird. Diese Schwierigkeit könnte man wahrscheinlich umgehen:

1) Durch mehrfachen Zusatz von Adenosin. 2) Durch Verwendung eines nicht abbaubaren Derivates, z.B. 2-Chloroadenosin. Aus der Tatsache, daß einmalige Zugabe von PGE_1 ausreicht, um einen Langzeiteffekt zu erzeugen, kann geschlossen werden, daß PGE_1 in diesem System nicht verändert wird.

Die unterschiedliche Wirkung von PGE_1 und Adenosin im Langzeitversuch schließt aber nicht aus, daß sie im Gehirn einander ähnliche Langzeiteffekte ausüben. Im Gegensatz zur Zellkultur könnte Adenosin im Gehirn kontinuierlich nachgeliefert werden.

III. Studien zur akuten Wirkung von Opiaten und Neurotrans- mittern.

1. Opiate und Narkotica.

1.1. Vorbemerkung.

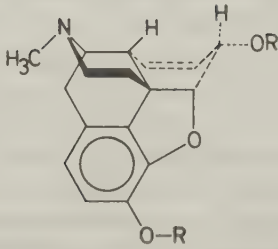
Unter Opiaten verstand man ursprünglich die Alkaloide des Opiums, welches aus den unreifen Kapseln des Mohnes "papaver somniferum" gewonnen wird. Diese Alkaloide machen etwa 25 Gewichtsprozent des Opiums aus. Man kann sie in zwei Klassen unterteilen, die Phenanthrene (Morphin, Thebain) und die Benzylisochinoline (Papaverin, Noscapin), die sich in ihren pharmakologischen Eigenschaften klar unterscheiden (155).

Morphin (Abb.23A) ist das wichtigste Phenanthrenalkaloid des Opiums und ist auch für die pharmakologischen Wirkungen des Opiums bestimmend. Heroin wird durch Acetylierung beider OH-Gruppen synthetisiert (Abb. 23A). Es kommt nicht natürlich vor.

Morphin und seine Derivate beeinflussen vor allem das ZNS und die Verdauungsorgane. Es hat stark narkotische Wirkung (Analgesie, Schläfrigkeit, Stimmungsänderung und Sinnestrübung). Die meisten Patienten mit starken Schmerzen werden durch kleine bis mittlere Dosen (5-10 mg) völlig schmerzfrei. Morphin beeinflußt selbst in kleinen Dosen die Atemtätigkeit, vermutlich durch direkte Wirkung auf das Atemszentrum im Hirnstamm. Sterben Menschen an Morphinvergiftung, so ist in den meisten Fällen eine Lähmung der Atmung daran schuld. Morphin, spezifischer jedoch Codein (155), unterdrückt den Hustenreflex, vermutlich durch direkte Wirkung auf das Hustenzentrum in der Medulla. Noch lange bevor Opium als Analgeticum Verwendung fand, wurde es zur Behandlung von Durchfall und Ruhr eingesetzt, da es die Darmperistaltik stark einschränkt.

Abb. 23.

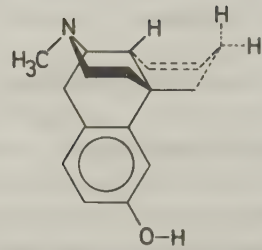
A.



R=H: Morphin

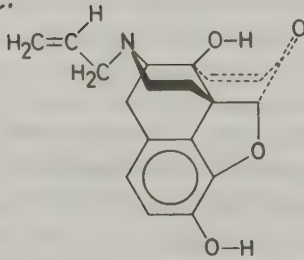
R=CH₃CO: Heroin

B.



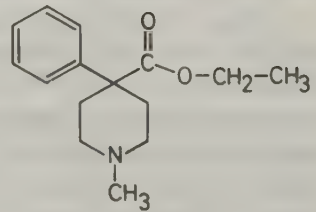
Levorphanol

C.



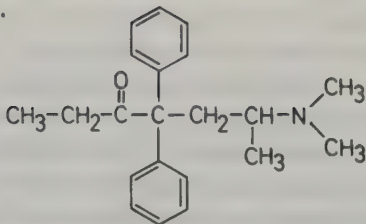
Naloxon

D.



Meperidin

E.



Methadon

Neben den Phenanthrenalkaloiden des Opiums gibt es noch weitere synthetische Narkotica, die - obwohl strukturell verschiedenen - ein ähnliches Wirkungsspektrum wie das Morphin haben. Die wichtigsten sind Methadon (Abb. 23 E) und Meperidin (Abb. 23 D).

Wie die meisten basischen Amine verläßt Morphin sehr rasch die Blutbahn und wird in Organen wie Niere, Lunge, Leber und Milz konzentriert. Es wird vor allem in der Leber metabolisiert und schließlich im Urin ausgeschieden. Obwohl der Hauptwirkungsort das ZNS ist, passieren im erwachsenen Menschen oder Tier nur geringe Mengen die Blut-Hirn-Schranke. Je lipophiler ein Morphin-Derivat ist, um so leichter durchdringt es diese Barriere und um so wirksamer ist es. Daraus erklärt sich die hohe Wirksamkeit von Diacetylmorphin (Heroin) (Abb. 23A), Levorphanol (Abb. 23B) und Etorphin (156,157).

Da sich die Wirkung der Opiate hauptsächlich im Gehirn manifestiert, muß es dort Gehirnzellen-Neuronen oder Glia- geben, die diese Moleküle erkennen und auf sie reagieren können. Tatsächlich sind im Gehirn autoradiographisch (158,159) und durch Bindungsstudien (160,161) Opiatrezeptoren nachgewiesen worden. Sie sind vor allem im Gehirnstamm lokalisiert (Zwischenhirn, Mittelhirn und Medulla oblongata) (162,163). Unklar blieb der Zelltyp an dem sich die Morphinrezeptoren befinden. Durch elektrophysiologische Untersuchungen war jedoch bereits sehr wahrscheinlich gemacht worden, daß sie auf Neuronen lokalisiert sind (164-168).

Während die physiologischen Wirkungen und die Bindungsorte des Morphins bekannt waren, lag der Wirkungsmechanismus der Opiate völlig im Dunkeln. In den Kapiteln B.III. und B.V. möchten wir über die Wirkung von Opiaten auf Zellkulturen des Nervensystems berichten, zunächst in Kapitel B.III. über die akuten Effekte, also die Kurzzeitwirkungen des Morphins und seiner Analoga.

Möglicherweise fördern die Untersuchungen das Verständnis des molekularen Ablaufs der Opiatwirkung.

1.2. Morphin- und Prostaglandinwirkung in Neuroblastoma- und Neuroblastoma x Glioma-Hybrid-Zellen.

Opiate und Prostaglandine wirken in entgegengesetzter Richtung auf glatte Muskulatur, indem sie, je nach Gewebe, entweder Kontraktion oder Relaxation auslösen (125-130). Es lag nahe, den Antagonismus zwischen Morphin und Prostaglandin an glatter Muskulatur in vitro zu untersuchen. So analysierte Sanner (126) die Wirkung von Morphin auf durch PGE_2 induzierte Kontraktionen des isolierten Meerschweinchenileums (Morphin im Konzentrationsbereich zwischen 35 nM bis 100 μM). Die Hemmung der Kontraktion war in keinem Falle vollständig. Bei der wirksamsten Konzentration von 0,35 μM Morphin wurde eine durchschnittliche Verminderung der PGE_2 -induzierten Kontraktion um 81 % erzielt. Bei 100 μM Morphin betrug die Hemmung nur noch 45 %.

Da PGE_1 den cAMP-Spiegel in Neuroblastoma - und Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen erhöht, prüften wir, ob Morphin auch in diesem System die Wirkung des PGE_1 unterdrücken würde (169).

Dazu wurden die beiden Zelltypen 10 min lang mit steigenden Konzentrationen an Morphin in An- oder Abwesenheit von PGE_1 inkubiert. Dann wurde in Medium und Zellen der Gehalt an cAMP bestimmt.

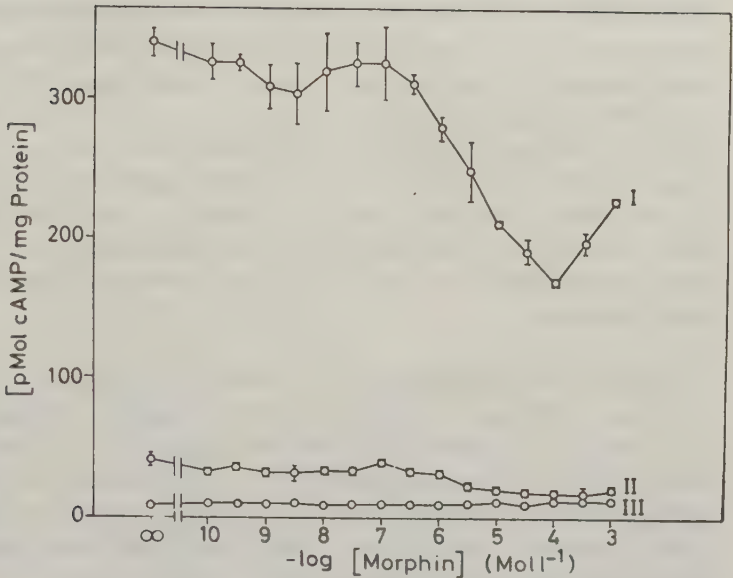


Abb. 24. Hemmung der PGE_1 -Wirkung in Neuroblastomazellen N4TG3 durch Morphin. N4TG3 Zellen werden in An- und Abwesenheit von PGE_1 mit steigenden Konzentrationen Morphin inkubiert. Kurve I: cAMP in Zellen + Medium, Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ PGE_1 ; Kurve II: cAMP im Medium, Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ PGE_1 ; Kurve III: cAMP in Zellen + Medium, kein PGE_1 . $17,6 \times 10^6$ lebende Zellen pro Platte, Passage 27, Lebensfähigkeit 96 %.

Abb. 24 (Kurve I) zeigt, wie in Neuroblastomazellen steigende Mengen Morphin den durch PGE_1 verursachten cAMP-Anstieg hemmen. Der Effekt wird deutlich zwischen $0,1$ und $100 \mu\text{M}$ Morphin. Bis zu 12 % der so gebildeten cAMP-Gesamtmenge wird im Inkubationsmedium gefunden (Kurve II). Der Austritt von cAMP ins Medium wurde bereits in anderem Zusammenhang erwähnt (Kapitel B.I.3.5).

Da der Anteil an cAMP im Medium unter den gewählten Inkubationsbedingungen immer niedrig ist (ca. 10 % der Gesamtmenge), wurde bei den weiteren Untersuchungen auf eine Messung des cAMP-Spiegels im Medium verzichtet. Überraschenderweise nimmt die Hemmwirkung von Morphin wieder ab, wenn seine Konzentration 100 μM überschreitet. Dieses Phänomen wurde bei vielen Experimenten beobachtet und soll später diskutiert werden (S. 67). In Abwesenheit von PGE_1 beeinflusst Morphin den cAMP-Spiegel kaum (Kurve III). Nur bei einem Teil der Versuche war bei hohen Morphinkonzentrationen (1 mM) ein Anstieg des cAMP-Spiegels erkennbar.

Inkubiert man Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen 10 min lang mit PGE_1 (Abb. 25), so werden bedeutend höhere cAMP-Spiegel erreicht als in Neuroblastomazellen (Kurve I). Wie bei den Neuroblastomazellen verhindert auch hier Morphin die durch PGE_1 ausgelöste Erhöhung des cAMP-Spiegels (Kurve I). Bei sehr hoher Morphin-Konzentration (1 mM) hemmt auch hier Morphin weniger stark. Dieser Wiederanstieg (Kurve I) war von Versuch zu Versuch verschieden steil.

Die Hybridzellen sind sensitiver gegenüber Morphin als die Neuroblastomazellen. Eine 50 %ige Inhibierung (IC_{50}) erfolgt bei den Hybriden bereits bei 5 μM Morphin gegenüber 400 μM bei den Neuroblastomazellen. Ähnlich wie die maximale Stimulierbarkeit durch PGE_1 kann auch die Hemmbarkeit durch Morphin stark schwanken. In manchen Experimenten mit Neuroblastomazellen N4TG3 wurden IC_{50} -Werte von 5-20 μM erreicht, in anderen hemmte Morphin nicht einmal bei einer Konzentration von 10 oder gar 100 μM . Auch bei den Hybridzellen wurden solche Schwankungen beobachtet, die jedoch längst nicht so häufig und so stark waren. Ein völliger Verlust der Hemmbarkeit wurde nie beobachtet.

Ähnlich wie bei den Neuroblastomazellen hat Morphin alleine

keine erkennbare Wirkung auf den cAMP-Spiegel (Kurve II). In anderen Fällen war auch hier bei hohen Morphinkonzentrationen (1 mM) ein cAMP-Anstieg zu verzeichnen.

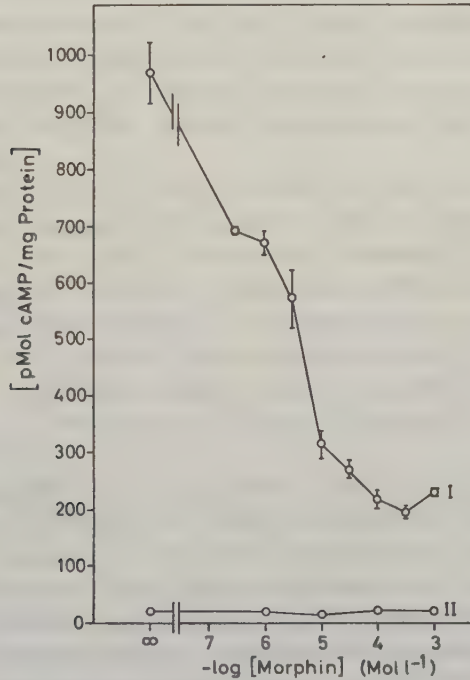


Abb. 25. Hemmung der PGE_1 -Wirkung in Hybridzellen 108CC15 durch Morphin. Intrazelluläre cAMP-Spiegel.
Kurve I: $3 \mu\text{M PGE}_1$; Kurve II: ohne PGE_1 .
 $5,9 \times 10^6$ lebende Zellen pro Platte, Passage 14,
Lebensfähigkeit 85 %.

Inzwischen wurde durch Bindungsstudien gezeigt (59), daß die Hybridzellen weit mehr Morphinrezeptoren besitzen als Neuroblastomazellen. Die Unterschiedlichkeit der IC_{50} -Werte könnte hindeuten auf: 1) Molekulare Unterschiede der Rezeptoren oder 2) auf identische Rezeptoren, die bei unterschiedlicher Belegung mit Morphin den halbmaximalen biologischen Effekt zeigen. Die zweite, von uns bevorzugte Erklärungsmöglichkeit beinhaltet, daß die Rezeptoren in wechselndem Maße an die von Ihnen gesteuerten Systeme gekoppelt sein könnten.

Ist die Wirkung des Morphins auf die Zellen stereospezifisch? Um das zu klären, wurde an Stelle des Morphins Levorphanol bzw. Dextrorphan eingesetzt. Levorphanol (Abb. 23B), ein Derivat des Morphins, hat im Tierversuch dieselbe Wirkung wie Morphin selbst, während Dextrorphan, das optische Enantiomere des Levorphanols, im biologischen Test unwirksam ist. Bei Konzentrationen von $1 \mu M$ und darüber hemmt Levorphanol, nicht aber Dextrorphan, die Wirkung des PGE_1 (Abb. 26).

Abb. 27 zeigt, daß auch andere Opiate und Narkotica den PGE_1 -Effekt hemmen. Levorphanol (Kurve IV), Methadon (Kurve V), Heroin (Kurve III) und Morphin (Kurve II) hemmen teilweise schon bei sehr niedrigen Konzentrationen, Meperidin (Kurve I) erst bei einer Konzentration über $100 \mu M$. Levorphanol, Methadon und Heroin blockieren bei hohen Konzentrationen den PGE_1 -Effekt vollständig, Morphin hingegen nur teilweise. Vorversuche zeigen, daß diese Unterschiede nicht durch unterschiedlichen zeitlichen Verlauf der Hemmung der PGE_1 -Wirkung durch Opiate erklärt werden können.

Die Wirksamkeit verschiedener Narkotica (Abb. 27) läßt sich kaum mit in vivo-Verhältnissen korrelieren, wo Methadon und Morphin einerseits, Heroin und Levorphanol andererseits etwa äquipotente Analgetica sind und die zweite Gruppe zehnmal stärker wirkt als die erste (155). Meperidin, dessen

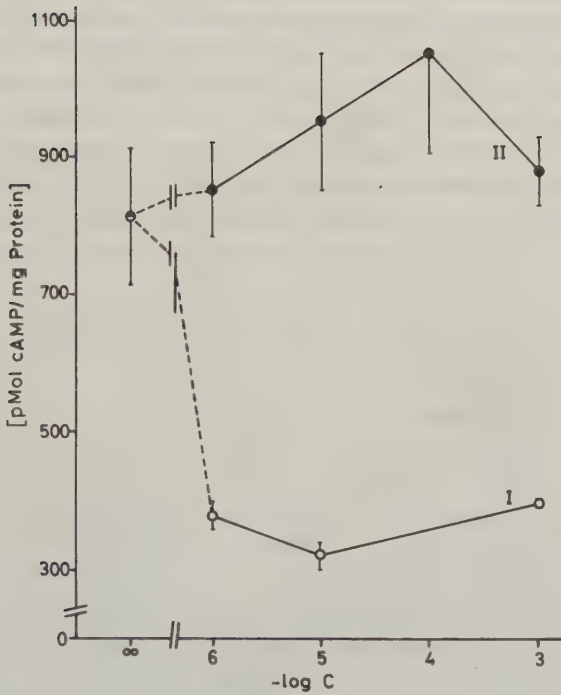


Abb. 26. cAMP-Bildung in Gegenwart von $3 \mu\text{M PGE}_1$ und steigenden Konzentrationen C von Levorphanol (Kurve I) oder Dextrorphan (Kurve II). Inkubationszeit 10 min. Kontrollwerte in Abwesenheit von PGE_1 liegen zwischen 9,6 und 13,1 pMol cAMP/mg Protein. $1,6 \times 10^6$ lebende Hybridzellen 108CC15 pro Platte, Passage 18, Lebensfähigkeit 90 %.

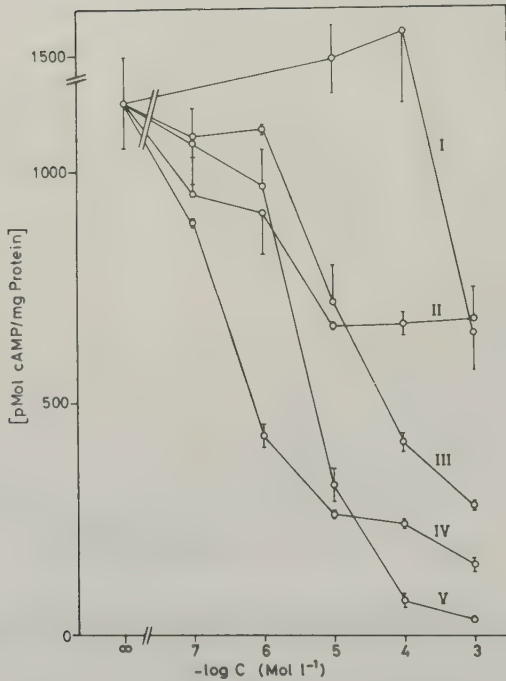


Abb. 27. Hemmung der PGE_1 -Wirkung durch verschiedene Analgetica. PGE_1 -Konzentration: $3 \mu\text{M}$. Inkubationsbeginn 3 h nach Mediumwechsel (siehe Abb. 15). Inkubationszeit 10 min. Kurve I, Meperidin; Kurve II, Morphin; Kurve III, Heroin; Kurve IV, Levorphanol; Kurve V, Methadon. 2×10^6 lebende Hybridzellen 108CC15 pro Platte, Passage 14, Lebensfähigkeit 97 %.

analgetische Wirkung 10 % derjeniger von Morphin ist, wirkt auf die Hybridzellen noch nicht einmal bei einer Konzentration von 100 μM . Da in den Zellkulturen Absorption und Abbau vermutlich und die Blut-Hirn-Schranke mit Sicherheit keine Rolle spielen, verwundert nicht, daß die Ergebnisse aus Versuchen an Zellkultur und am intakten Tier nicht quantitativ übereinstimmen. Für die Aufklärung des molekularen Mechanismus der Morphinwirkung dürfte das Fehlen solcher "physiologischer Störfaktoren" im Modellsystem hilfreich sein.

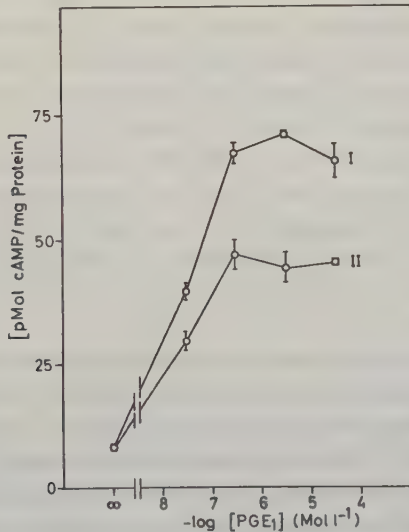


Abb. 28. cAMP-Bildung in Gegenwart von PGE_1 oder PGE_1 und Morphin als Funktion der PGE_1 -Konzentration. Kurve I, Abwesenheit von Morphin; Kurve II, 30 μM Morphin. $19,4 \times 10^6$ lebende Neuroblastomazellen N4TG3 pro Platte, Passage 37, Lebensfähigkeit 99 %.

Als nächstes war wichtig zu wissen, ob PGE_1 und Morphin über denselben Rezeptor wirken. Dazu wurden Neuroblastomazellen 10 min mit steigenden Konzentrationen an PGE_1 in Anwesenheit (Abb. 28, Kurve II) oder Abwesenheit (Abb. 28, Kurve I) einer konstanten Menge Morphin inkubiert. Wie aus Kurven I und II von Abb. 28 ersichtlich, lassen selbst sehr hohe PGE_1 -Konzentrationen den Morphineffekt nicht verschwinden. Dies beweist, daß die Hemmung des PGE_1 -Effekts durch Morphin nichtkompetitiv ist und folglich Morphin- und PGE_1 -Rezeptor verschieden sein müssen.

Ratten-Gliomazellen C6-BU-1 und Ratten-Glioma x Mäuse-Fibroblast-Hybride 54SCC11 können sowohl durch PGE_1 als auch durch NA zur Bildung von cAMP angeregt werden (65). Da sie keine neuronalen Eigenschaften besitzen, können sie zur Beantwortung folgender Fragen verwendet werden:

- 1) Antagonisiert Morphin die PGE_1 -Wirkung auch in Zellen nichtneuronalen Ursprungs oder Charakters?
- 2) Falls ja, antagonisiert es an solchen Zellen neben PGE_1 auch noch andere Neurohormone, die die Bildung von cAMP stimulieren?

Obengenannte Zellen wurden vor der Messung des cAMP-Gehalts in An- oder Abwesenheit von NA bzw. PGE_1 10 min lang mit Morphin inkubiert. Morphin alleine beeinflusst die cAMP-Spiegel in den Linien C6-BU-1 (Abb. 29, Kurve I) und 54SCC11 (Kurve III) nicht. Es antagonisiert weder die stimulierende Wirkung von PGE_1 auf 54SCC11 - (Kurve IV) und C6-BU-1-Zellen (Kurve V) noch von NA auf 54SCC11 - (Kurve II) und C6-BU-1-Zellen (Kurven VI und VII).

Tab. 7 zeigt, daß die Steigerung des cAMP-Spiegels dieser Zellen durch NA sehr wohl durch eine geeignete Substanz inhibiert werden kann. In beiden Zell-Linien verhindert Propranolol den durch NA auslösbarer Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels.

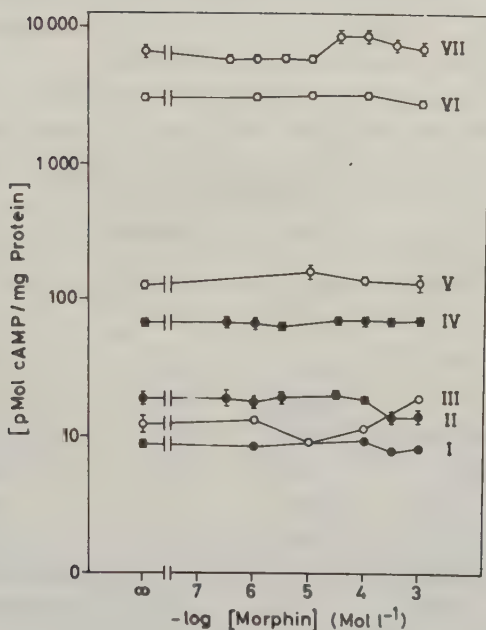


Abb. 29. Morphin und die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels durch PGE_1 und NA in Gliomazellen C6-BU-1 und Glioma x Fibroblast-Hybridzellen 54SCC11. Kurve I, 54SCC11, keine Hormone; Kurve II, 54SCC11, 100 μM NA; Kurve III, C6-BU-1, keine Hormone; Kurve IV, 54SCC11, 3 μM PGE_1 ; Kurve V, C6-BU-1, 10 μM PGE_1 ; Kurve VI und VII, C6-BU-1, 1 bzw. 100 μM NA. C6-BU-1: $51,4 \times 10^6$ lebende Zellen pro Platte, Passage 31, Lebensfähigkeit 100 %. 54SCC11: 6×10^6 lebende Zellen pro Platte, Passage 6, Lebensfähigkeit 94 %.

Tab. 7. Der β -adrenerge Antagonist Propranolol hemmt den durch NA ausgelösten Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels in Gliomazellen und Glioma x Fibroblast-Hybridzellen. Inkubationszeit 10 min.

Zell-Linie	Konzentrationen der zugegebenen Drogen (μM)		cAMP
	L-NA	D,L-Propranolol	pMol/mg Protein
Glioma C6-BU-1	0	0	12 ± 2
	0	200	10 ± 2
	1	0	3100 ± 40
	100	0	6500 ± 600
	100	200	13 ± 2
Glioma x Fibroblast-Hybrid 54SCC11	0	0	9 ± 2
	0	100	10 ± 1
	100	0	19 ± 2
	100	100	9 ± 1

Das Ergebnis zeigt, 1) daß Morphin- und PGE_1 -Rezeptoren unabhängig voneinander auftreten - ein weiterer Hinweis dafür, daß sie verschiedene Moleküle sind - und 2) daß wahrscheinlich Gliazellen keine Morphinrezeptoren besitzen. In Übereinstimmung hiermit wurde inzwischen durch Bindungsstudien nachgewiesen, daß Neuroblastomazellen, Neuroblastoma x Glioma- und Neuroblastoma x L-Zell-Hybride Morphinrezeptoren tragen, nicht aber Gliomazellen (59).

Verhindert Morphin den Anstieg des cAMP-Spiegels in jedem Falle, auch wenn dieser Anstieg durch andere Hormone als PGE_1 , durch Phosphodiesterase-Hemmer oder durch Zugabe bestimmter Ionen verursacht wird? Neben PGE_1 , Adenosin und MIBX erhöhen auch Mn^{2+} -Ionen den cAMP-Spiegel in Neuroblastoma x Glioma Hybrid-

zellen. Tab. 8 zeigt, daß der Anstieg des cAMP-Spiegels in allen vier Fällen durch Morphin gehemmt wird.

Tab. 8. Morphin antagonisiert außer der Wirkung von PGE_1 (siehe Abb. 25) auch die von MIBX, Adenosin und MnSO_4 .

Zusatz (μM)	pMol cAMP / mg Protein			
	Experiment I	Experiment II	Experiment III	Experiment IV
Kontrolle	15	46	42	97 ± 4
Morphin (10)	-	44	37	75 ± 2
Morphin (100)	18	-	-	-
MIBX (500)	33	230 ± 16	-	-
MIBX+Morphin (10)	-	108 ± 14	-	-
MIBX+Morphin (100)	21	-	-	-
Adenosin (10)	-	-	152 ± 7	-
Adenosin (100)	-	-	280 ± 36	-
Adenosin (10) + Morphin (10)	-	-	62 ± 1	-
Adenosin (100) + Morphin (10)	-	-	84 ± 4	-
lebende Zellen pro Platte 10^6	2,8	3,3	3,3	2,7
Passage	14	21	21	9
Lebensfähigkeit (%)	97	97	97	94

Hybridzellen 108CC15. Experiment II: Zellen für 3 h mit PGE_1 ($1 \mu\text{M}$) vorinkubiert (im Wachstumsmedium), dann inkubiert wie im Text zu Abb. 20 beschrieben. Experiment IV: Zellen zunächst 30 min mit 10 mM MnSO_4 vorinkubiert (im Inkubationsmedium). Dann Morphin zugegeben und 10 min inkubiert. Bei Experiment II und III Inkubationsbeginn sofort, bei Experiment I und IV 3 h nach Mediumwechsel (siehe Abb. 15). Dauer der Hauptinkubation jeweils 10 min.

Da PGE_1 und Adenosin die cAMP-Konzentration durch Erhöhung der Synthesegeschwindigkeit ansteigen lassen und MIBX durch Blockierung des Abbaus bei konstanter Synthesegeschwindigkeit, kann man schließen, daß Morphin den cAMP-Spiegel senkt, weil es die Synthesegeschwindigkeit verringert. Messungen der Adenylatcyclase-Aktivität an Homogenaten der Hybridzellen haben dementsprechend ergeben, daß Morphin die Erhöhung der Adenylatcyclase-Aktivität durch PGE_1 verhindert (57).

Morphinvergiftungen kann man behandeln, indem man dem Patienten einen Antagonisten des Morphins spritzt (155). Die meisten Antagonisten, z.B. Nalorphin oder Pentazocin, besitzen neben ihren antagonistischen auch agonistische, d.h. morphin-ähnliche Wirkungen, was ihre Verwendung in hohen Dosen gefährlich macht. Von diesem Nachteil frei soll Naloxon (Abb. 23C) sein (170), das als reiner Antagonist des Morphins gehandelt wird.

Die Frage, ob Naloxon die Wirkung des Morphins an unseren Zellkulturen hemmen kann, wurde zunächst an Neuroblastomazellen untersucht. Dazu wurden sie in An- und Abwesenheit von Morphin mit PGE_1 und steigenden Mengen Naloxon inkubiert (10 min) (Abb. 30). Naloxon alleine steigert den cAMP-Spiegel erst bei einer Konzentration von mehr als $100 \mu\text{M}$ (Kurve III). Der inhibitorische Effekt von $100 \mu\text{M}$ Morphin wird durch $1-10 \mu\text{M}$ Naloxon aufgehoben (Abb. 30, Kurven I und II). Bei hoher Konzentration verstärkt Naloxon die Wirkung des PGE_1 stark (Kurve I). Dieser Effekt ist größer, wenn zusätzlich noch Morphin zugegen ist (Kurve II). Dieses Resultat zeigt, daß Morphin und Naloxon in Konzentrationen von $0,1 - 1 \text{ mM}$ nicht antagonistisch, sondern synergistisch wirken.

Man könnte daraus schließen, daß es für Opiate und ihre Antagonisten zwei Bindungsorte unterschiedlicher Bindungsfestigkeit gibt. Vom Bindungsort (Rezeptor) mit hoher Bindungsaffinität kann der Antagonist Naloxon den Agonisten Morphin

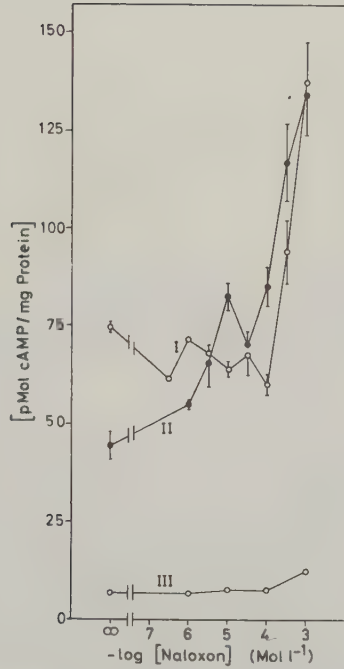


Abb. 30. Naloxon verhindert die Wirkung des Morphins an Neuroblastomazellen N4TG3. Kurve I, 3 μM PGE₁; Kurve II, 3 μM PGE₁ + 100 μM Morphin; Kurve III, ohne PGE₁ und Morphin. $16,1 \times 10^6$ lebende N4TG3-Zellen, Passage 29, Lebensfähigkeit 91 %.

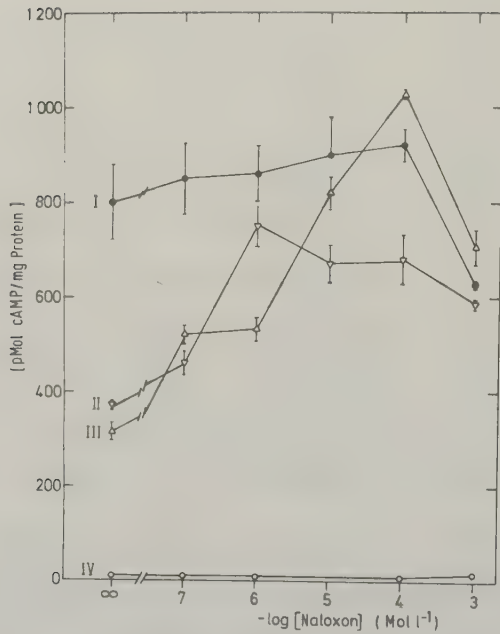


Abb. 31. Naloxon verhindert die Morphinwirkung in Hybridzellen 108CC15. Inkubationsbeginn 3 h nach Mediumwechsel (siehe Abb. 15). Inkubationszeit 10 min. Kurve I, 3 μM PGE_1 ; Kurve II, 3 μM PGE_1 + 10 μM Morphin; Kurve III, 3 μM PGE_1 + 100 μM Morphin; Kurve IV, ohne PGE_1 und Morphin. $1,3 \times 10^6$ lebende Zellen pro Platte, Passage 11, Lebensfähigkeit 96 %.

verdrängen, ohne dessen Wirkung zu übernehmen. Am anderen Bindungsort niedriger Bindungsaffinität können sich Morphin und Naloxon gegenseitig auch in der Wirkung ersetzen. Während also über den Rezeptor mit hoher Affinität die Adenylatcyclase-Aktivität gesenkt wird, wird sie über den Rezeptor mit niedriger Affinität erhöht. Dafür spricht auch der Wiederanstieg des cAMP-Spiegels bei hohen Morphinkonzentrationen, den wir in Abb. 24 und 25 gesehen haben.

Auch bei Hybridzellen beseitigt Naloxon den hemmenden Einfluß des Morphins auf die Wirkung des PGE_1 (Abb. 31). Worauf die Senkung des cAMP-Spiegels bei hohen Naloxon-Konzentrationen beruht, ist unbekannt.

2. Neurotransmitter.

2.1. Vorbemerkung.

Das periphere vegetative Nervensystem läßt sich anhand des synaptischen Überträgerstoffes einteilen in das cholinerge System, welches AcCh, und das adrenerge System, welches NA verwendet (171-173).

In Zellen mit cholinergem "input" kann das AcCh über zwei Rezeptortypen wirken, entweder über einen nicotinischen oder einen muscarinischen (174). Nicotinische Rezeptoren herrschen vor an Muskelendplatten und autonomen Ganglien. Sie können durch Nicotin stimuliert und durch D-Tubocurarin, einem Inhaltsstoff des indianischen Pfeilgiftes Curare, blockiert werden. Muscarinische Rezeptoren findet man vor allem in visceralen autonomen Zielzellen (Eingeweidezellen). Diese Rezeptoren werden durch Muscarin stimuliert und durch Atropin blockiert.

Auch in Zellen mit adrenergem "input" haben pharmakologische Kriterien zur Definition zweier Klassen von Rezeptoren geführt (174), der α - und der β -adrenergen. α -Rezeptoren vermitteln z.B. Kontraktion der Blutgefäße und der glatten Muskulatur, Pupillenerweiterung oder Anregung exokriner Drüsen. Sie werden direkt stimuliert durch das synthetische Phenylephrin und blockiert durch Phentolamin. Die β -Rezeptoren vermitteln z.B. Erschlaffung der Blutgefäße, Entspannung der glatten Muskulatur der Bronchien oder Erhöhung der Geschwindigkeit und der Kraft des Herzschlags. Sie werden direkt stimuliert durch das nicht natürlich vorkommende Isoprotorenol (Isopropylnoradrenalin) und blockiert durch Propranolol.

Durch Bindung an ihre Rezeptoren können Neurotransmitter elektrische Aktivität in den entsprechenden Zielzellen aus-

lösen und - was im Zusammenhang mit dieser Arbeit wichtig ist - die Aktivität der Enzyme Adenylat- oder Guanylatcyclase beeinflussen (113,115).

2.2. Wirkung von Neurotransmittern in Neuroblastoma- und Neuroblastoma x Glioma-Hybrid-Zellen.

(a) Adrenerge Agonisten.

Seit einiger Zeit weiß man, daß NA in Gliomazellen C6-BU-1 den intrazellulären cAMP-Spiegel erhöht (64). Diese Wirkung wird über einen β -Rezeptor vermittelt, läßt sich also durch Propranolol vollständig hemmen (siehe Tab. 7). Inkubiert man Neuroblastomazellen oder Hybridzellen mit NA, so fällt auf, daß die cAMP-Werte gegenüber den Kontrollen von Fall zu Fall leicht erniedrigt sind (65).

Von dieser Beobachtung ausgehend fragten wir uns, ob NA nicht auch in Gegenwart von PGE_1 die cAMP-Spiegel erniedrigt. Antagonisiert NA, analog den Opiaten, die Wirkung des PGE_1 ? Um diese Frage zu beantworten, wurden Hybridzellen 108CC15 in Anwesenheit von PGE_1 mit aromatischen Aminen steigender Konzentration 10 min lang inkubiert (Abb. 32). Die aromatischen Amine verhindern den durch PGE_1 hervorgerufenen Anstieg des cAMP-Spiegels. Die Empfindlichkeit der Zellen für Amine fällt in der Reihenfolge NA (Kurve I, IC_{50} : 0.05 μM), Dopamin (Kurve III, IC_{50} : 0,5 μM), Isoproterenol (Kurve IV, IC_{50} : 5 μM). Die Hemmkurve für Phenylephrin (Kurve II, IC_{50} : 1,2 μM) verläuft biphasisch. Die Gründe hierfür sind unbekannt.

Die Tatsache, daß die Sensitivität der Zellen für NA höher ist als die für Isoproterenol, weist auf α -Rezeptoren hin. Experimente in Anwesenheit von Inhibitoren der α - oder

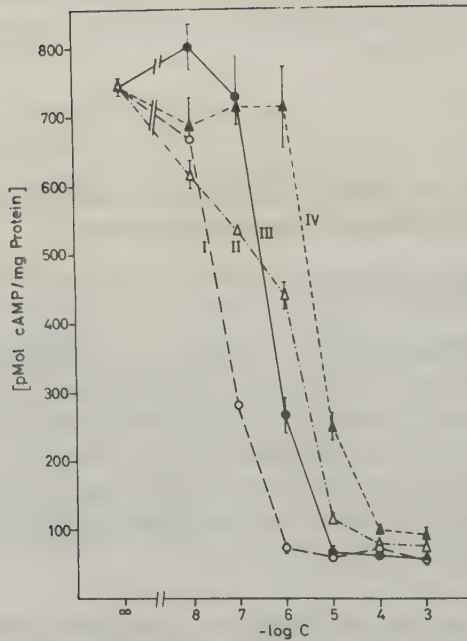


Abb. 32. Bildung von cAMP in der Gegenwart von $3 \mu\text{M PGE}_1$ und steigenden Konzentrationen von NA (Kurve I), Phenylephrin (Kurve II), Dopamin (Kurve III) und Isoproterenol (Kurve IV). Die Kontrollwerte in Abwesenheit von PGE_1 liegen zwischen 5,5 und 8,6 pMol cAMP/mg Protein. 2×10^6 lebende Hybridzellen 108CC15 pro Platte, Passage 6, Lebensfähigkeit 91 %.

Tab. 9. Wirkung adrenerger Agonisten und Antagonisten auf die intrazellulären cAMP-Spiegel von Hybridzellen 108CC15 nach Stimulation durch PGE_1 .

Antagonist	Konzentration (μM)	Agonist			
		Kontrolle	L-NA (10 μM)	Dopamin (10 μM)	D,L-Isoproterenol (20 μM)
Kontrolle	-	1210 $\pm$ 70	151 $\pm$ 35	228 $\pm$ 24	488 $\pm$ 40
Phentolamin	10	-	543 $\pm$ 46	1040 $\pm$ 70	1040 $\pm$ 80
	100	1350 $\pm$ 30	957 $\pm$ 61	1040 $\pm$ 90	1040 $\pm$ 70
Haloperidol	10	1440	165 $\pm$ 12	395 $\pm$ 27	665 $\pm$ 46
	100	-	340 $\pm$ 40	765 $\pm$ 35	1290 $\pm$ 20
Propranolol	10	-	176 $\pm$ 18	298 $\pm$ 32	817 $\pm$ 73
	100	1630 $\pm$ 20	237 $\pm$ 33	643 $\pm$ 133	1230 $\pm$ 100

Alle Inkubationen (10 min) in Anwesenheit von 3 μM PGE_1 . Die Kontrollwerte in Abwesenheit von PGE_1 sind (pMol cAMP/mg Protein): ohne Zugabe 12; 10 μM NA 13; 10 μM Dopamin 22; 200 μM D,L - Isoproterenol 19; 100 μM Phentolamin 17; 100 μM Haloperidol 12; 200 μM D,L-Propranolol 11. $1,5 \times 10^6$ lebende Zellen pro Platte, Passage 10, Lebensfähigkeit 98 %.

β -Rezeptoren untermauern dies (Tab. 9). Die Reaktion der Zellen auf NA, Dopamin oder Isoproterenol wird viel stärker gehemmt durch den α -adrenergen Blocker Phentolamin als durch den Dopamin-Antagonisten Haloperidol oder den β -adrenerger Blocker Propranolol.

NA hemmt den Effekt des PGE_1 auch in der Neuroblastoma-Linie N4TG3 und der Hybrid-Linie 108CC25 (175) (Tab. 10). Auch die Erhöhung des cAMP-Spiegels durch MIBX in den Linien 108CC15

(Daten nicht gezeigt) und 108CC25 (Tab.10) werden durch NA gehemmt. NA wirkt also nicht über eine Erhöhung der Phosphodiesterase-, sondern über eine Verringerung der Adenylatcyclase-Aktivität. Dies hatten wir schon im Fall des Morphins festgestellt (Tab. 8).

Tab. 10. Wirkung von PGE_1 , Morphin, NA und MIBX auf die intrazellulären cAMP-Spiegel (pMol/mg Protein) von Neuroblastoma- und Hybridzellen. Inkubationszeit 10 min.

Zusatz	Konzentration (μM)	Zell-Linie		
		N4TG3	108CC15	108CC25
Kontrolle	-	6	10	16
PGE_1	3	122	811 ± 109	116 ± 16
NA	100	5	14 ± 0	9 ± 3
MIBX	500	-	41	42
Morphin	10	-	-	15
Morphin	100	-	-	8
PGE_1 + NA	3,100	45	120 ± 7	45 ± 1
PGE_1 + Morphin	3,100	-	-	90
PGE_1 + Morphin	3,10	-	-	106
PGE_1 + MIBX	3,500	-	-	1230
NA + MIBX	100,500	-	-	24
lebende Zellen pro Platte $\times 10^{-6}$		8	1.6	0.8
Lebensfähigkeit %		-	90	94

(b) Cholinerge Agonisten.

Aus elektrophysiologischen Untersuchungen war bekannt, daß AcCh bei Hybridzellen Aktionspotentiale auslöst (72), also AcCh-Rezeptoren vorhanden sein müssen. Kann ähnlich wie NA und Morphin auch AcCh die Erhöhung des cAMP-Spiegels in den Hybridzellen verhindern?

Zur Beantwortung dieser Frage wurden die Hybridzellen mit PGE_1 und steigenden Konzentrationen von AcCh 10 min lang inkubiert. Um einem möglichen Abbau des AcCh vorzubeugen, enthielten die Inkubationen $100 \mu\text{M}$ des AcCh-Esterase-Hemmers Eserin. Inzwischen wissen wir allerdings, daß man auf Eserin verzichten kann. AcCh verhindert den durch PGE_1 ausgelösten Anstieg des cAMP-Spiegels ($\text{IC}_{50}: 0,1 \mu\text{M}$) (Abb. 33, Kurve I). In Abwesenheit von PGE_1 senkt AcCh den cAMP-Spiegel nicht merklich (Kurve II).

Um nun die cholinergen Rezeptoren zu klassifizieren, die den AcCh-Effekt vermitteln, wurden die Hybridzellen in Gegenwart konstanter Konzentrationen von PGE_1 , AcCh und Eserin und unterschiedlichen Konzentrationen von AcCh-Rezeptorblockern inkubiert, bevor der cAMP-Spiegel bestimmt wurde. Während der muscarinische Antagonist Atropin die Wirkung des AcCh unterdrückt ($\text{IC}_{50} 10 \text{ nM}$) (Abb. 34, Kurve I), sind die nicotinischen Antagonisten D-Tubocurarin und α -Bungarotoxin (ein Schlangengift) (176) unwirksam (Kurve IV und III). Selbst wenn die Zellen vor Zugabe der anderen Drogen 30 min mit α -Bungarotoxin vorinkubiert wurden, ist kaum eine Wirkung des Toxins zu bemerken (Kurve II). In einem hier nicht gezeigten Versuch konnten wir nachweisen, daß α -Bungarotoxin selbst bei Konzentrationen bis zu $100 \mu\text{M}$ unwirksam ist. Auch Antikörper gegen nicotinische AcCh-Rezeptoren, die wir von E. Heilbronn bekommen haben, konnten die Wirkung des AcCh nicht unterdrücken.

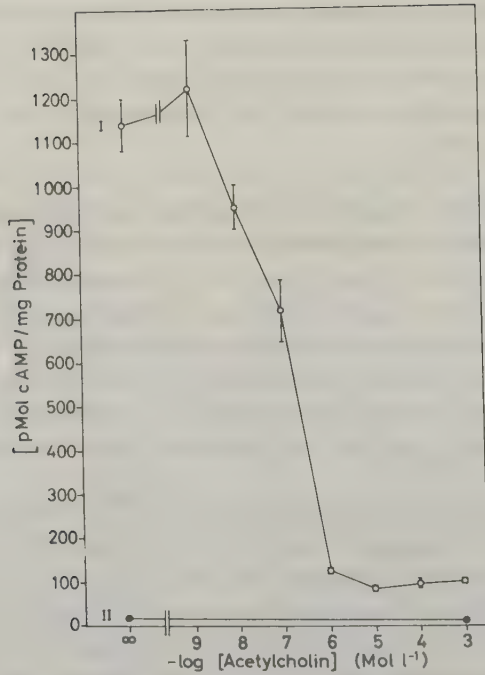


Abb. 33. Hemmung der PGE_1 -Wirkung als eine Funktion der AcCh-Konzentration. Kurve I, 3 μM PGE_1 ; Kurve II, ohne PGE_1 . Um Abbau des AcCh zu verhindern, war in allen Inkubationen 100 μM Eserin zugegen. $2,4 \times 10^6$ lebende Hybridzellen 108CC15 pro Platte, Passage 12, Lebensfähigkeit 96 %.

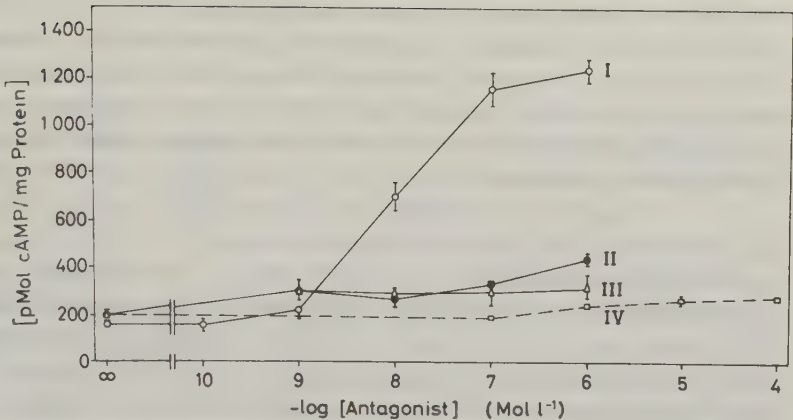


Abb. 34. Wirkung cholinergischer Antagonisten auf die Hemmung des PGE_1 -Effekts durch AcCh in Hybridzellen 108CC15. Neben PGE_1 ($3\mu\text{M}$) enthalten allen Inkubationen (10 min) $10\mu\text{M}$ AcCh, $100\mu\text{M}$ Eserin und steigende Konzentrationen cholinergischer Antagonisten. Die Werte in Kurve I wurden aus einem getrennten Experiment erhalten. Kontrollwerte (pMol cAMP/mg Protein): Kurve I, Eserin 17, AcCh+ Eserin 10, Atropin ($1\mu\text{M}$) +Eserin 22, Atropin + Eserin + AcCh 18, PGE_1 + Eserin 1100, PGE_1 + Eserin + Atropin 1030; Kurven II - IV, keine Zugabe oder AcCh alleine 10, PGE_1 alleine 1200, PGE_1 + Eserin 1600. Kurve I, Atropin; Kurve II, α -Bungarotoxin, 30 min Vorinkubation, dann erst andere Drogen zupipettiert; Kurve III, α -Bungarotoxin zusammen mit anderen Drogen zupipettiert; Kurve IV, D-Tubocurarin. Giftwirkung des α -Bungarotoxins wurde festgestellt durch den Tod von fünf Mäusen nach Injektion von $4\mu\text{g}$ des Toxins. 2,6 bzw. $1,1 \times 10^6$ lebende Zelle pro Platte Passage 14 bzw. 13, Lebensfähigkeit 91 bzw. 98 % für die Zellen von Kurve I bzw. II - IV.

Diese Experimente zeigen, daß die AcCh-Rezeptoren undifferenzierter, nicht mit DBCA behandelter Hybridzellen muscarinisch sind. Jedenfalls gilt das, solange PGE_1 zugegen ist. Diskrepanzen hierzu ergeben sich bei cGMP-Messungen in Abwesenheit von PGE_1 (51). Interessant ist außerdem, daß elektrophysiologische Untersuchungen an differenzierten Hybridzellen (72) ein anderes Bild ergeben. Die AcCh-Rezeptoren sind in diesem Falle sensitiv gegenüber Atropin, D-Tubocurarin und α -Bungarotoxin. Die Gründe für die unter verschiedenen Versuchsbedingungen beobachteten unterschiedlichen Rezeptorspezifitäten müssen noch untersucht werden.

Das AcCh-Analogon Carbamylcholin wirkt ähnlich auf die Hybridzellen 108CC15 und 108CC25 wie AcCh (Tab. 11). Es unterdrückt den Anstieg des cAMP-Spiegels, der von MIBX oder Prostaglandin hervorgerufen wird. Auch cholinerge Agonisten wirken also durch Erniedrigung der Adenylatcyclase- und nicht Erhöhung der Phosphodiesterase-Aktivität. Opiate, adrenerge sowie cholinerge Agonisten wirken anscheinend nach demselben Mechanismus.

Tab. 11. Wirkung von Carbamylcholin, PGE_1 und MIBX auf die cAMP-Spiegel von Hybridzellen.

Zusatz (μM)	Hybrid-Linie	
	108CC15	108CC25
Kontrolle	10	16
PGE_1 (3)	811 ± 109	116 ± 16
Carbamylcholin (100)	12 ± 1	11 ± 3
PGE_1 (3) + Carbamylcholin (100)	168 ± 22	60 ± 3
MIBX (500)	41	42
MIBX (500) + Carbamylcholin (100)	24	23 ± 1

Inkubationszeit 10 min. $1,6 \times 10^6$ lebende Hybridzellen 108CC15 pro Platte, Passage 18, Lebensfähigkeit 90 %. $0,8 \times 10^6$ lebende Hybridzellen 108CC25 pro Platte, Lebensfähigkeit 94 %.

2.3. Sind die Rezeptoren für AcCh, NA und Morphin identisch?

Die Ähnlichkeiten in der Wirkung cholinergischer und adrenerger Agonisten sowie von Opiaten sind auffallend. Wenn auch vom chemischen Standpunkt aus unwahrscheinlich, so war doch nicht von vornherein auszuschließen, daß Vertreter dieser drei Stoffklassen über denselben Rezeptor wirken könnten. Abb. 35 zeigt, daß Naloxon den durch PGE_1 verursachten Anstieg des cAMP-Spiegels nicht verhindern kann (Kurve I). Dieser Versuch zeigt noch einmal, daß PGE_1 und Opiate über verschiedene Rezeptoren wirken. Naloxon verhindert weder die durch AcCh (Kurve II), noch die durch NA (Kurven III und IV) bewirkte Hemmung des Anstiegs des cAMP-Spiegels in Gegenwart von PGE_1 .

In einem zweiten Versuch (Tab. 12) wird gezeigt, daß Naloxon zwar die Wirkung des Morphins, aber nicht die des NA oder AcCh hemmt.

Tab. 12. Naloxon hemmt die Wirkung des Morphins, aber nicht die des AcCh oder NA.

Konzentration von Naloxon (μM)	Kontrolle (pMol cAMP/ mg Protein)	L-NA cAMP	Agonist (10 μM) AcCh	Morphin
0	1580 $\pm$ 30	151 $\pm$ 18	228 $\pm$ 16	1140 $\pm$ 70
10	1660 $\pm$ 10	-	241 $\pm$ 5	1640 $\pm$ 20
100	2130 $\pm$ 90	149 $\pm$ 1	269 $\pm$ 24	2090 $\pm$ 230

In allen Inkubationen 3 μM PGE_1 zugegen. Inkubationsbeginn 3 h nach Mediumwechsel (siehe Abb. 15). $1,8 \times 10^6$ lebende Hybridzellen 108CC15 pro Platte, Passage 7, Lebensfähigkeit 99 %.

Die Rezeptoren für die adrenergen bzw. cholinergen Agonisten einerseits und die Opiate andererseits sind demnach mit

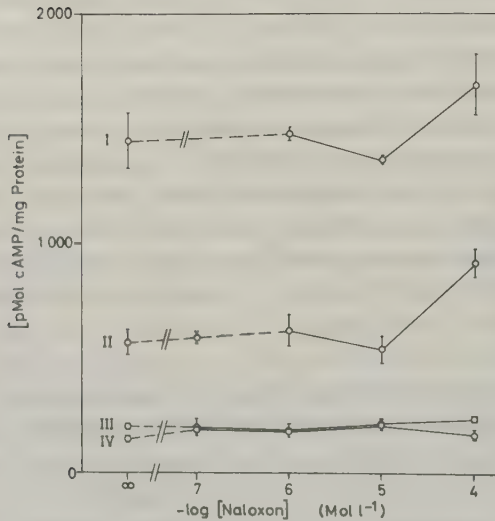


Abb. 35. Naloxon beeinflusst die Wirkung von PGE_1 , NA und AcCh nicht. Inkubationsbeginn 3 h nach Mediumwechsel (siehe Abb. 15). Inkubationszeit 10 min. Kurve I, $3 \mu\text{M PGE}_1$; Kurve II, $3 \mu\text{M PGE}_1 + 1 \mu\text{M AcCh}$; Kurve III, $3 \mu\text{M PGE}_1 + 1 \mu\text{M NA}$; Kurve IV, $3 \mu\text{M PGE}_1 + 0,1 \mu\text{M NA}$. $3,3 \times 10^6$ lebende Hybridzellen 108CC15 pro Platte; Passage 8, Lebensfähigkeit 99 %.

Sicherheit verschiedene Moleküle. Dies wurde auch durch Opiat-Bindungsstudien an Hirnhomogenaten gezeigt (160,161).

Es muß nun noch gezeigt werden (Tab. 13), daß auch NA- und AcCh-Rezeptor nicht identisch sind. Phentolamin hemmt die NA-Antwort (Tab. 9), aber nicht die AcCh-Antwort (Tab. 13). Für Atropin gilt das Umgekehrte (Tab. 13 und Abb. 34). D-Tubocurarin und α -Bungarotoxin interferieren ebensowenig

mit der NA- wie Propranolol mit der AcCh-Wirkung (Tab. 13). Bei der Interpretation der in Anwesenheit von AcCh erhaltenen Daten muß beachtet werden, daß Phentolamin und Propranolol die cAMP-Spiegel stark erhöhen, die mit PGE_1 alleine erreicht werden (Tab. 13).

Tab. 13. NA- und AcCh-Rezeptoren sind nicht identisch.

Antagonist	Konzentration (μM)	Agonist		
		Kontrolle	L-NA (10 μM)	AcCh (10 μM)
-	-	1580 $\pm$ 30	151 $\pm$ 18	228 $\pm$ 16
Phentolamin	100	2050 $\pm$ 60	-	364 $\pm$ 21
Propranolol	100	2270 $\pm$ 110	-	489 $\pm$ 44
Atropin	100	1980	141 $\pm$ 3	-
D-Tubocurarin	100	1710	142 $\pm$ 15	-
α -Bungarotoxin	1	1520	93 $\pm$ 15	-

Inkubationsbeginn 3 h nach Mediumwechsel (siehe Abb. 15).
 Alle Inkubationen in Anwesenheit von 3 μM PGE_1 (10 min).
 Sonstige Daten wie in Tabelle 12.

3. Die Rolle des cGMP.

Diskussion des Zusammenspiels von Adenylat- und Guanylat-cyclase anhand von Modellvorstellungen und Versuchen.

Neben dem cAMP kommt in der Zelle cGMP vor. 1963 wurde es nach Injektion von ^{32}P -Phosphat im Urin von Ratten als radioaktive Verbindung entdeckt (177). Die strukturelle Verwandtschaft zum cAMP legte den Schluß nahe, daß es ebenfalls als "second messenger" bei Hormonwirkungen fungiere (113). Erst 1970 entdeckte man, daß AcCh bei der Perfusion des Rattenherzens nicht nur die Amplitude der Herzmuskelkontraktion senkte, sondern auch den cGMP-Spiegel rasch ansteigen ließ (178). Inzwischen wurden zahlreiche Beispiele dafür gefunden, daß Hormone den cGMP-, nicht aber cAMP-Spiegel erhöhen. Außer für AcCh, wurde dies z.B. für Oxytocin, Serotonin und Calcitonin gezeigt (115). In jüngster Zeit wurde erstmals berichtet, daß ein Hormon - und zwar PGE_1 - in einem Neuroblastomaklon nacheinander sowohl die cGMP- als auch die cAMP-Spiegel anheben soll (53). Auch bei der Regulation des Zellwachstums sollen cAMP und cGMP von Bedeutung sein (179).

Hormone, die den zellulären cAMP-Spiegel erhöhen, verursachen im allgemeinen physiologische Wirkungen, die denen entgegengesetzt sind, die von Hormonen verursacht werden, welche den cGMP-Spiegel steigern (180). Einem Vorschlag von S. Cha folgend, stellten N. Goldberg und Mitarbeiter diesen Dualismus in Analogie zu den miteinander in Widerstreit liegenden alten chinesischen Prinzipien Yin und Yang (115).

Wie wir in den vorhergehenden Kapiteln B. III. 1. und III. 2. gesehen haben, hebt PGE_1 den cAMP-Spiegel an, während NA, AcCh und Morphin ihn absenken. Wir stellten die Hypothese auf, daß der Abfall des cAMP-Spiegels von einem Anstieg des cGMP-Spiegels begleitet sein könnte. Ermutigend war, daß in menschlichen Blutplättchen ein ähnlicher Fall schon beobachtet

worden war (181): Während PGE_1 den cAMP-Spiegel erhöht, senkt ihn NA und erhöht den cGMP-Spiegel.

Tatsächlich hat R.J. Gullis in unserem Labor gefunden, daß Morphin, AcCh und NA, wie wir postuliert hatten, den intrazellulären cGMP-Spiegel erhöht (51,52,58). Überraschenderweise ist die Erhöhung des cGMP-Spiegels nur von sehr kurzer Dauer. Das Maximum des cGMP-Spiegels wird in Gegenwart von Carbamylcholin bereits nach 1 min erreicht (51). Nach ca. 10 min können die Werte wieder auf den Ausgangspegel zurückgefallen sein. Man könnte annehmen, daß neben der Stimulation der Guanylatcyclase gleichzeitig oder kurz danach auch eine cGMP-spezifische Phosphodiesterase aktiviert wird. Ähnliche Beobachtungen wurden für NA und Morphin gemacht. In allen Fällen konnte Gullis nachweisen, daß, sobald der cGMP-Spiegel ansteigt, der cAMP-Spiegel fällt und umgekehrt (51,52,58). Die cGMP-Spiegel liegen meist 1-2 Größenordnungen unter denjenigen von cAMP.

Was ist der molekulare Mechanismus dieser gegenläufigen Regulation? Auf welcher Ebene findet sie statt? Es könnte z.B. sein, daß als Folge der Bindung eines Liganden L (AcCh, NA oder Morphin) an seinen Rezeptor R zuerst cGMP gebildet wird, welches vielleicht mittels einer von ihm aktivierten Proteinkinase die Adenylatcyclase zu einer inaktiven Form phosphoryliert (Abb. 36 A). Das würde heißen, daß der Anstieg des cGMP-Spiegels einem Abfall des cAMP-Spiegels vorausseilen sollte, was Gullis bisher allerdings nicht feststellen konnte.

Das Absinken der Adenylatcyclase-Aktivität in Gegenwart der Liganden AcCh, NA oder Morphin könnte aber auch von einer Erhöhung des cGMP-Spiegels in der Zelle unabhängig sein (Abb. 36 B). Dann müsste man sich vorstellen, daß Bindung eines solchen Liganden an seinen Rezeptor gleichzeitig die Guanylatcyclase aktiviert und die Adenylatcyclase hemmt.

(A) $L + R \longrightarrow [LR] \longrightarrow$ Aktivierung der Guanylatcyclase $\longrightarrow$ Erhöhung des cGMP-Spiegels

$\longrightarrow$ Aktivierung einer Protein-kinase durch cGMP $\longrightarrow$ Inaktivierung der Adenylatcyclase durch Phosphorylierung mittels Proteinkinase und ATP

(B) $L + R \longrightarrow [LR] \longrightarrow$ Aktivierung der Guanylatcyclase und gleichzeitige Inaktivierung der Adenylatcyclase $\longrightarrow$ Erhöhung des cGMP- und gleichzeitige Senkung des cAMP-Spiegels

(C) $L + R \longrightarrow [LR] \longrightarrow$ Änderung der Permeabilität eines Ions (z.B. Ca^{2+}) durch die Plasmamembran $\longrightarrow$ Erhöhung der intrazellulären Konzentration eines Ions (z.B. Ca^{2+})

Abb. 36. Drei Hypothesen (A,B,C) zur Aktivierung der Guanylatcyclase- und Hemmung der Adenylatcyclase-Aktivität nach Bindung der Liganden L (AcCh, NA, Morphin) an ihre Rezeptoren R (249).

Diese beiden Hypothesen wurden experimentell geprüft. Da wir davon ausgehen, daß der Mechanismus für alle drei Substanzen gleich ist, haben wir für den Versuch Carbamylcholin, ein Analogon des AcCh, ausgewählt.

Hybridzellen 108CC15 wurden 1 bis 20 min lang mit 1 μ M Carbamylcholin vorinkubiert, um einen bestimmten intrazellulären cGMP-Spiegel einzustellen. Wir wußten (51), daß der cGMP-Spiegel bereits in der ersten Minute seinen Maximalwert erreicht, um dann innerhalb von 10 min wieder zum Ausgangswert abzufallen. Nach Abschluß der Vorinkubation mit Carbamylcholin - also bei einem vorgegebenen und gemessenen cGMP-Spiegel - wurde PGE_1 bzw. PGE_1 + Atropin zugegeben und weitere 10 min inkubiert.

Betrachten wir zunächst die möglichen Ergebnisse des vorerst nur angedeuteten Versuches. Nehmen wir an, daß Adenylatcyclase bei erhöhtem cGMP-Spiegel inaktiviert wird (Abb. 36 A). Nun sollte PGE_1 dann nicht mehr stimulierend wirken, wenn es bei momentan hohem cGMP-Spiegel zupipettiert wird - also z.B. 1 min nach der Zugabe des Carbamylcholins. Wird andererseits PGE_1 erst dann zupipettiert, wenn der cGMP-Spiegel wieder gefallen ist (10-20 min nach Carbamylcholin-Zugabe), dann sollte PGE_1 in gewohnter Weise den cAMP-Spiegel erhöhen.

Es könnte aber auch sein, daß die Adenylatcyclase auch dann noch inaktiviert ist, wenn die Erhöhung des cGMP-Spiegels längere Zeit (10-20 min) zurückliegt. In diesem Fall würde die Erinnerung der Zelle an die frühere Erhöhung des cGMP-Spiegels als verringerte Aktivität der Adenylatcyclase gespeichert sein.

Nehmen wir jedoch an, daß Adenylat- und Guanylatcyclase unabhängig voneinander reguliert werden, das Hormon also gleichzeitig eine Erhöhung der Guanylat- und eine Senkung der Adenylatcyclase - Aktivität bewirkt (Abb. 36 B). Dann würde die Dauer der - durch Atropinzusatz beendeten - Vorinkubation mit Carbamylcholin ohne Einfluß auf die Wirkung des PGE_1 sein. Die Vorinkubation wäre überflüssig, wichtig für das Ausmaß der PGE_1 -Wirkung wäre nur, ob Carbamylcholin gleichzeitig mit PGE_1 zugegen ist oder nicht.

Nun zum Versuch (Abb. 37 A). Kurve II gibt die cGMP-Werte nach der jeweiligen Vorinkubation zum Zeitpunkt der PGE_1 -Zugabe an. Die zugehörigen cAMP-Werte zeigt Kurve I. Die Balken (Vorinkubationszeiten 0-20 min) geben die cAMP-Spiegel jeweils 10 min nach Zusatz von PGE_1 zum carbamylcholinhaltigen Medium an. In Bestätigung früherer Untersuchungen (51) wird bei Inkubation mit Carbamylcholin der maximale cGMP-Spiegel innerhalb von 1 min erreicht; nach 5 min ist der Ausgangswert wieder erreicht (Abb. 37 A, Kurve II). Unabhängig davon, wie lange mit Carbamylcholin vorbehandelt wurde, wird nach 10-minütiger Inkubation mit Carbamylcholin und PGE_1 der gleiche erniedrigte (gegenüber PGE_1 allein) cAMP-Spiegel gefunden (Abb. 37 A, Säulen). Die Höhe des cGMP-Spiegels bei Beginn der jeweiligen 10 min-Inkubation ist somit ohne Einfluß auf die Adenylatcyclase-Aktivität.

Abb. 37 B zeigt das Ergebnis eines analogen Versuches, der sich von ersterem (Abb. 37 A) nur darin unterscheidet, daß während der 10 min dauernden Inkubation neben PGE_1 auch noch Atropin zugegeben war. Atropin wurde zugegeben, um die Wirkung des Carbamylcholins auf die Vorinkubationszeit zu beschränken.

Der Verlauf des cGMP-Spiegels während der Vorinkubationszeit mit Carbamylcholin entspricht weitgehend dem in Abb. 37 A.

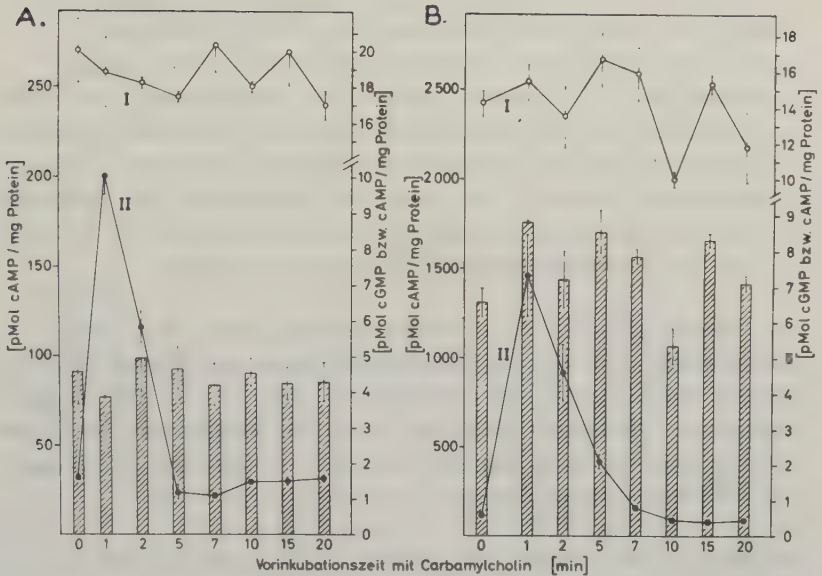


Abb. 37. Einfluß des intrazellulären cGMP-Spiegels auf die Erhöhung des cAMP-Spiegels durch PGE₁. A. Zugabe von 3 μM PGE₁ nach verschieden langer Vorinkubation mit 1 μM Carbachol (0-20 min). Bei jedem cAMP- (Kurve I) bzw. cGMP-Wert (Kurve II) (rechte Ordinate) ist der cAMP-Spiegel (Säulen) angegeben, der 10 min nach Zugabe des PGE₁ gemessen wurde (linke Ordinate). Messung des cAMP- und cGMP-Spiegels vor bzw. des cAMP-Spiegels nach der 10-minütigen Inkubation mit PGE₁ an Replikaplaten. Kontrollwert: 3 μM, PGE₁ (10 min), 266-26 pMol cAMP/mg Protein. 2,5x10⁶ lebende Hybridzellen 108CC15 pro Platte, Passage 18, Lebensfähigkeit 99 %. B. Wie in A, jedoch während der 10-minütigen Inkubation mit 3 μM PGE₁ immer 1 μM Atropin zugegen. Kontrollwerte (Inkubationszeit 10 min): 3 μM PGE₁, 1410-180; 3 μM PGE₁ + 1 μM Carbachol, 420-25; 3 μM PGE₁ + 1 μM Atropin, 1440-145 pMol cAMP/mg Protein.

Die nach der 10 min - Inkubation mit PGE_1 + Carbamylcholin + Atropin gefundenen cAMP-Spiegel (Abb. 37 B, Säulen) sind unabhängig vom cGMP-Spiegel bei Beginn der Inkubation (Abb. 37 B, Kurve II). Atropin hebt in fast allen Fällen (Ausnahme bei $t = 10$ unerklärlich) die cAMP-Spiegel auf die in Gegenwart von PGE_1 gefundenen Werte an. Für die Aktivität der Adenylatcyclase scheint also nicht die Höhe des cGMP-Spiegels als vielmehr die momentane Anwesenheit des Carbamylcholins entscheidend zu sein. Diese Feststellung ist mit dem in Abb. 36 B beschriebenen Mechanismus vereinbar.

Ein diesem (Abb. 37 B) analoger Versuch (Abb. 38) wurde unternommen, bei dem die Vorinkubationsperiode nicht durch Zusatz von Atropin, sondern durch Auswaschen des cholinergen Agonisten (in diesem Fall AcCh) beendet wurde. Auch in diesem Fall erinnerten sich die Zellen nicht an ihre Vorbehandlung mit dem cholinergen Agens.

Diesem Ergebnis könnte ein Versuch widersprechen, bei dem wir cGMP, ins Inkubationsmedium gegeben haben, anstatt es von den Zellen synthetisieren zu lassen. In einem Fall (Abb. 39, Kurve I) wurden steigende Mengen cGMP und PGE_1 zusammen 10 min lang inkubiert. Im anderen Fall wurde zunächst mit steigenden Konzentrationen cGMP 30 min lang vorinkubiert, dann wurde PGE_1 zupipettiert und weitere 10 min inkubiert (Kurve II). Exogenes cGMP hemmt den von PGE_1 verursachten Anstieg des cAMP-Spiegels, wenn auch nicht annähernd so stark wie AcCh oder NA. Die Ergebnisse der beiden Versuche (Kurven I und II) unterscheiden sich in zweierlei Hinsicht. cGMP hemmt stärker (max. 30 %), wenn es gleichzeitig mit PGE_1 eingesetzt wird (Kurve I), als wenn es 30 min vor PGE_1 zugegeben wird (Kurve II). Dies könnte darauf hindeuten, daß cGMP während der Vorinkubationsperiode rasch abgebaut wird. Außerdem findet man bei cGMP-Konzentrationen über $10 \mu\text{M}$ einen Rückgang der Hemmung bis hin zu einer Potenzierung der PGE_1 -Wirkung

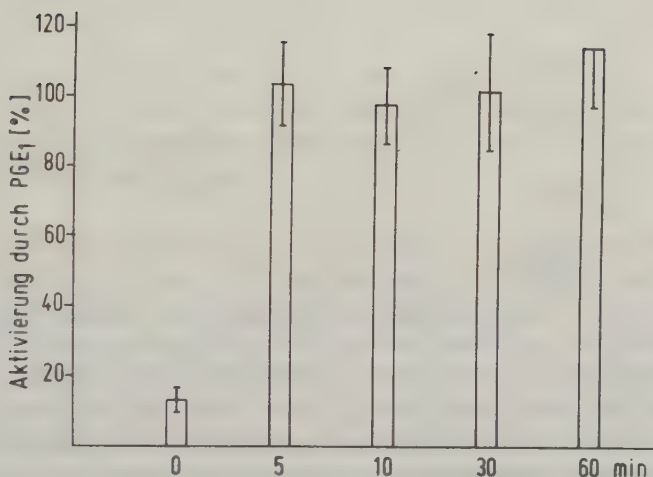


Abb. 38. Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels in Hybridzellen 108CC15 durch PGE₁ nach Behandlung mit AcCh. t = 0 min: 3 μ M PGE₁ + 10 μ M AcCh 10 min lang inkubiert. t = 5 - 60 min : 10 min lang mit AcCh vorinkubiert, Inkubationsmedium entfernt, Zellen 2 x gewaschen, neues Inkubationsmedium zugegeben, 5-60 min gewartet, schließlich 10 min lang mit PGE₁ inkubiert. Inkubationen mit AcCh in Gegenwart von 100 μ M Eserin. Kontrollinkubationen (jeweils 10 min): 3 μ M PGE₁, 1140 ± 100 ; 3 μ M PGE₁ + 10 μ M AcCh, 148 ± 27 pMol cAMP/mg Protein. $2,6 \times 10^6$ lebende Zellen pro Platte, Passage 14, Lebensfähigkeit 90 %.

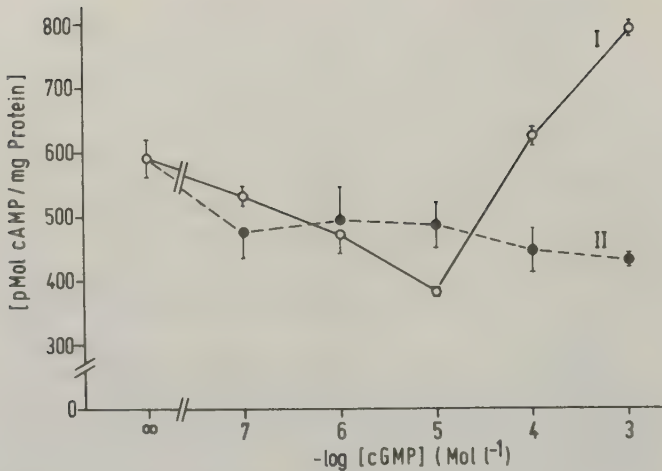


Abb. 39. Einfluß des dem Medium zugesetzten cGMP auf die Höhe der Stimulation des cAMP-Spiegels durch PGE_1 . Mediumwechsel 3 h vor der Hauptinkubation (siehe Abb. 15). Kurve I, $3 \mu\text{M}$ PGE_1 und steigende Konzentrationen cGMP zusammen für 10 min inkubiert. Kurve II, zunächst 30 min mit cGMP vorinkubiert, dann $3 \mu\text{M}$ PGE_1 zugegeben und weitere 10 min inkubiert. $2,5 \times 10^6$ lebende Hybridzellen 108CC15 pro Platte, Passage 20, Lebensfähigkeit 98 %.

(Kurve I). Diesen zweiten Effekt des cGMP könnte man damit erklären, daß cGMP das cAMP kompetitiv von einer Phosphodiesterase mit hohem K_M -wert verdrängt und damit den Abbau von cAMP verringert. Kurve I scheint also durch Überlagerung zweier gegenläufiger Kurven entstanden zu sein. Das könnte bedeuten, daß die Hemmwirkung von cGMP größer ist, als Kurve I zeigt. Obige Erklärung der zweiten Phase von Kurve I impliziert, daß cGMP in die Zelle eindringen kann und daß die genannte Phos-

phodiesterase nicht nur in vitro, sondern auch in vivo von cGMP erreicht wird. Da cGMP-Konzentrationen über $10 \mu\text{M}$ in vivo nicht vorkommen dürften, ist dieser Befund nicht von zellphysiologischer, sondern von theoretischer Bedeutung.

Die Diskrepanz zwischen den in Abb. 37, 38 und 39 beschriebenen Versuchen macht deutlich, daß der in Abb. 36A dargestellte Mechanismus ohne weitere Versuche nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann.

Eine weitere Möglichkeit, den Mechanismus der gegenläufigen Regulation der cAMP- und cGMP-Spiegel zu erklären, soll diskutiert werden. Die frühesten Veränderungen in einer Zelle nach Bindung eines Hormons an seiner Rezeptor sind Änderungen von Ionenpermeabilitäten, denen Änderungen des Membranpotentials entsprechen (Abb. 36 C). Damit ändern sich kurzzeitig die Konzentrationen von Ionen im Zellinneren. Diese Änderungen könnten für die Erhöhungen und Erniedrigungen der Cyclaseaktivitäten verantwortlich sein. Es ist auffällig, daß AcCh, NA und Morphin, die den cGMP-Spiegel erhöhen, depolarisierend und PGE_1 , das den cAMP-Spiegel erhöht, hyperpolarisierend auf die Hybridzellen wirkt (50). Dieselben Beziehungen zwischen PGE_1 und NA wurden auch an braunen Fettzellen gefunden (182). Die Richtigkeit dieser Hypothese hängt von der experimentellen Beantwortung der Alternative ab: Ist die zunächst ausgelöste Änderung der Ionenpermeabilität die Ursache der Änderung der Cyclaseaktivitäten oder löst die Bindung des Liganden an den Rezeptor Veränderungen der Ionenpermeabilität und der Cyclaseaktivitäten gleichzeitig unabhängig voneinander aus?

Um erste Hinweise auf den Einfluß von Ionenpermeabilitäten auf die Adenylatcyclase-Aktivität zu erhalten, wurden Neuroblastomazellen mit Substanzen inkubiert, die Ionenpermeabilitäten erhöhen (Ionophore) oder senken (Tab. 14). Besonders auffällig ist, daß der K^+ -Ionophor Valinomycin den cAMP-

Tab. 14. Einfluß verschiedener die Ionenpermeabilität der Zellmembran verändernder Substanzen auf die cAMP-Spiegel von Neuroblastomazellen N4TG3. Inkubationszeit 10 min. Werte in pMol cAMP/mg Protein. $7,9 \times 10^6$ lebende Zellen pro Platte, Passage 33, Lebensfähigkeit 87 %.

Zusatz	Konzentration (μM)	Erhöhung der Permeabilität der Membran für	Verminderung der Permeabilität der Membran für	ohne PGE_1 ($3 \mu\text{M}$)	mit
Kontrolle	-	-	-	6	122
Veratridin	90	Na	-	15	113
Tetrodotoxin	100	-	Na	6	47
Valinomycin	100	K	-	34	431
$\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{Cl}$	100	-	K	9	57
Protoveratrin A	100	Ca	-	6	57
Protoveratrin B	100	Ca	-	5	53
Bay A 1040	100	-	Ca	6	97

Spiegel sowohl in An- als auch in Abwesenheit von PGE_1 anhebt. Auch Veratridin, das die Na^+ -Permeabilität erhöht, steigert den cAMP-Spiegel, jedoch nur in Abwesenheit von PGE_1 . Die übrigen Drogen verändern den cAMP-Spiegel in Abwesenheit von PGE_1 kaum, verhindern aber teilweise den Anstieg der durch PGE_1 hervorgerufen wird. Ob sich gleichzeitig auch cGMP-Spiegel verändern, wissen wir noch nicht. Zur Zeit sind Arbeiten im Gange, die den Einfluß von Ionen und Ionenpermeabilitäten auf Cyclaseaktivitäten klären sollen.

4. Ist Morphin ein Neurotransmitter?

Diskussion der akuten Morphineffekte.

Wir haben gefunden, daß außer NA und AcCh auch Morphin den durch PGE_1 , Adenosin oder MIBX hervorgerufenen Anstieg des cAMP-Spiegels in kultivierten Zellen des Nervensystems hemmt. Andere Labors bestätigen dies (57) oder beschrieben, daß Morphin in Homogenaten von Hybridzellen (57) oder Rattengehirnen (118) die Stimulation der Adenylatcyclase durch PGE_1 unterdrückt. Morphinrezeptoren wurden nicht nur mit diesen indirekten Methoden, sondern auch direkt durch stereospezifische Bindung von radioaktivem Dihydromorphin an intakten Neuroblastoma- und Hybridzellen nachgewiesen (59). Genauso wie adrenerge und cholinerge Neurotransmitter erhöht Morphin den cGMP-Spiegel in Hybrid- und Neuroblastomazellen (51, 52, 58). Die mögliche Bedeutung des cGMP für die Regulation des cAMP-Spiegels wurde in Kapitel B.III.3 diskutiert.

Die erstaunliche Ähnlichkeit der Wirkung von Morphin und von Neurotransmittern wirft die Frage auf: Ist Morphin ein Neurotransmitter? Da Morphin im tierischen Körper nicht vorkommt, muß diese Frage verneint werden. Morphin könnte aber einen endogenen Neurotransmitter nachahmen. Tatsächlich zeigten mehrere Arbeitskreise (183-189), daß endogenes Morphin (Endorphin, Enkephalin, morphine-like factor) im Gehirn vorkommt. In jüngster Zeit wurden Aminosäuresequenz und Total-synthese zweier solcher Substanzen berichtet (190). Es handelt sich um zwei Pentapeptide, die sich in ihrer Sequenz nur um eine Aminosäure unterscheiden (H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu (oder Met)-OH). Möglicherweise gibt es im Organismus ein ganzes Spektrum solcher Peptide.

Von Moroder und Wunsch synthetisiertes Enkephalin wirkt in gleicher Weise ^{wie Morphin, NA oder AcCh} auf die Hybridzellen (191). Die Bestätigung von Hinweisen auf die Synthese von Enkephalin in Hybridzellen

bleibt Untersuchungen mit einem zu entwickelnden RIA vorbehalten.

Neuroblastomazellen und - wegen ihrer höheren Empfindlichkeit Morphin und Neurohormonen gegenüber - vor allem die Hybridzellen sind hilfreiche Modelle, um die Biochemie der Morphinwirkung zu studieren. Bekanntlich ist die Analgesie die medizinisch wichtige akute Wirkung des Morphins. Man kann auf Grund der Studien am Modellsystem annehmen, daß eine Erhöhung des cAMP-Spiegels in den für die Schmerzregistrierung wichtigen Neuronen Schmerz entspricht, eine Senkung des cAMP-Spiegels also mit Schmerzlinderung oder gar starkem Wohlbefinden korreliert ist. Dafür spricht, daß Theophyllin (Phosphodiesterasehemmer) oder cAMP nach Injektion in Mäuse (192) oder Ratten (192,193) den antinociceptiven Effekt von Morphin hemmen kann.

Ebensogut könnte die akute Opiatwirkung durch die invers verlaufende Veränderung des cGMP-Spiegels oder durch das Verhältnis der Spiegel beider cyclischen Nucleotide bestimmt werden. Wichtig ist in diesem Zusammenhang jedoch, daß cGMP den antinociceptiven Effekt von Morphin in der Maus nicht hemmen kann (192).

Es wurde vorgeschlagen (194), daß ein Mechanismus, durch den morphinähnliche Drogen analgetische (oder andere) Effekte verursachen, die Inhibierung der Stimulation der cAMP-Produktion durch PGE_1 sei. Daß nämlich PGE_1 in der Peripherie Schmerzen hervorrufen oder verstärken kann, wurde nachgewiesen (195,196). Daß dies auch für das ZNS zutrifft, gilt als wahrscheinlich. So ist Fieber, von dem man annimmt, daß es mit der Produktion und der Wirkung von PGE im Hypothalamus zusammenhängt (197), oft mit Kopfschmerzen verbunden. Darüberhinaus verursacht intravenöse Injektion von PGE_1 Kopfweh (198). Weil intracerebrale oder intraventriculäre Injektion

von PGE (197) oder cAMP (199) Fieber induziert, würde man erwarten, daß die Hemmung der PGE-stimulierten cAMP-Bildung durch Morphin nicht nur Schmerzen lindern, sondern auch Fieber senken müßte. Tatsächlich soll dies für Ratte und Kaninchen gezeigt worden sein (200). Analgetica und Antipyretica, von denen man weiß, daß sie die Prostaglandin-Biosynthese hemmen (z.B. Aspirin, Indometacin) (107,201), vergrößern die analgetische Wirkung von Narkotica (202,203). Nicht zuletzt gibt es Anzeichen dafür, daß cAMP selbst Schmerzen hervorruft, wenn es intravenös gespritzt wird (204).

Sehr häufig bewirken Prostaglandine und Morphin noch andere entgegengesetzte Effekte. So wirkt Prostaglandin in Mäusen als Sedativum (91) oder löst Diarrhoe aus (205). cAMP verursacht ähnliche Wirkungen (206,207). Morphin hingegen erzeugt bei Mäusen starke Unruhe und Obstipation (208,209).

Diese Tatsachen legen eine enge Verbindung zwischen Prostaglandin- und Morphinwirkung in vivo nahe. Der durch das Zusammenwirken von PGE₁ und Morphin variabel einstellbare cAMP-Spiegel könnte das biochemische Äquivalent sein für das Verhalten oder den Grad des Wohlbefindens nach Morphingenuß.

Morphin verhindert den Anstieg des cAMP-Spiegels der durch PGE₁, Adenosin oder MIBX hervorgerufen wird. Das läßt vermuten, daß auch in vivo nicht unbedingt PGE₁ der Gegenspieler des Morphins sein muß, sondern auch andere wie PGE₁ wirkende Neurohormone in Frage kommen.

IV. Optimierung der Inkubationsbedingungen.

Die Wahl geeigneter Inkubationsbedingungen ist entscheidend für Reproduzierbarkeit und Aussagekraft der Ergebnisse. Alle diesem Kapitel vorausgehenden und nachfolgenden Versuche wurden unter einheitlichen und optimierten Bedingungen ausgeführt, deren Erarbeitung Gegenstand dieses Kapitels ist.

Bei der Inkubation von Zellen mit Neurohormonen werden die intrazellulären cAMP- und cGMP-Spiegel verändert. Diese Antwort auf die Gegenwart der Hormone hängt ab von pH-Wert, Temperatur und Zusammensetzung des Inkubationsmediums.

1. Einflüsse von pH-Wert und Temperatur.

Da die Zellen saure Stoffwechselprodukte ausscheiden (im wesentlichen Milchsäure und CO_2), muß das Wachstumsmedium gepuffert sein. Als gut dazu geeignet hat sich ein Bicarbonat-Puffer erwiesen. Dem käuflichen Nährmedium DMEM werden 3,75g/l NaHCO_3 zugefügt. Bei einem CO_2 -Gehalt von 10 % im Inkubator stellt sich ein pH von 7,4 (37°C) ein. Häufiges Öffnen des Inkubators während eines Versuches stört das $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Gleichgewicht, da CO_2 entweicht. Das die Zellen umgebende Medium wird alkalisch (pH 8,0 - 8,5). Während eines Versuches könnte sich die Temperatur des Mediums in der Kulturschale ändern.

Wir haben diese pH- und Temperatureinflüsse auf die Bildung von cAMP untersucht. Dazu wurden Neuroblastomazellen in DMEM bei zwei verschiedenen Temperaturen und drei verschiedenen pH-Werten mit PGE_1 bzw. PGE_1 + Morphin inkubiert. Abb. 40 verdeutlicht zwei Dinge. Erstens sollte der pH-Wert im Normalbereich liegen (7,4 - 7,7) und dort möglichst konstant gehalten werden. Nur dann sind Stimulierung durch PGE_1 und Hemmung dieses Effekts durch Morphin deutlich meßbar. Zweitens ist die

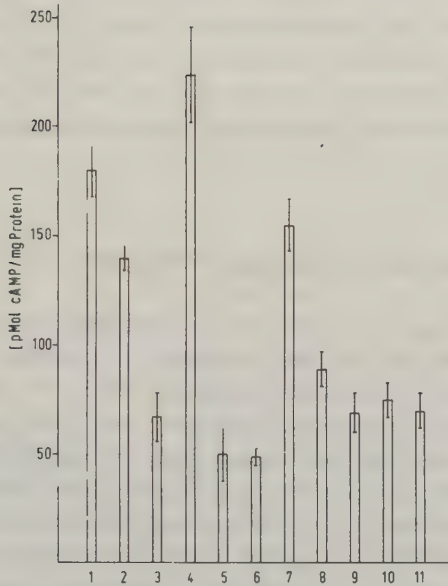


Abb. 40. pH- und Temperaturabhängigkeit der Erhöhung intrazellulärer cAMP-Spiegel durch PGE₁. Hemmung des PGE₁-Effektes durch Morphin als eine Funktion des pH-Wertes. Inkubationszeit 10 min; 3 µM PGE₁. pH 6,0-6,3 mit HCl eingestellt (Inkubation auf dem Wasserbad bei 37°C); pH 7,4-7,7 durch Begasen von DMEM mit 10 % CO₂ in Luft (Inkubation im Inkubator bei 37°C); pH 8,2-8,5 durch Stehenlassen von DMEM an Luft (Inkubation auf dem Wasserbad bei 37°C). Inkubationen bei 32°C auf dem Wasserbad; pH 7,4-7,7 in diesem Falle durch Begasen der Kulturschale mit 10% CO₂ in Luft eingestellt. Säule 1, 37°C, pH 8,2-8,5, PGE₁; Säule 2, 37°C, pH 7,4-7,7, PGE₁; Säule 3, 37°C, pH 6,0-6,3, PGE₁; Säule 4, 32°C, pH 8,2-8,5, PGE₁; Säule 5, 32°C, pH 7,4-7,7, PGE₁; Säule 6, 32°C, pH 6,0-6,3, PGE₁; Säule 7, 37°C, pH 8,2-8,5, PGE₁ + Morphin 10 µM; Säule 8, 37°C, pH 7,4-7,7, PGE₁ + Morphin 10 µM; Säule 9, 37°C, pH 6,0-6,3, PGE₁ + Morphin 10 µM; Säule 10, 37°C, pH 6,0-6,3, PGE₁ + Morphin 100 µM; Säule 11, 37°C, pH 6,0-6,3, PGE₁ + Morphin 300 µM; 6,7x10⁶ lebende Neuroblastomazellen N4TG3 pro Platte, Passage 29, Lebensfähigkeit 93 %.

Temperaturkonstanz wichtig. Im normalen pH-Arbeitsbereich (neutral bis schwach alkalisch) treten bei Veränderung der Temperatur große Verschiebungen der cAMP-Spiegel ein. Es ist unproblematisch, die Temperatur des Mediums in der Kulturschale während der Inkubation der Zellen mit Hormonen konstant zu halten (Kapitel C.IV.2.)

2. Einflüsse der Mediumzusammensetzung.

Aus einer Reihe von Gründen ist es schwierig, bei Kurzzeitinkubationen den pH-Wert konstant zu halten, wenn normales NaHCO_3 -gepuffertes DMEM verwendet wird. Es lag deshalb nahe, NaHCO_3 -freies Medium einzusetzen. Bei nicht zu hoher Zelldichte reicht die Pufferkapazität der Aminosäuren im NaHCO_3 -freien DMEM aus, um den pH-Wert für die Dauer der 10-minütigen Inkubation konstant zu halten. Allerdings muß das durch Fehlen des NaHCO_3 entstandene osmotische Defizit des Mediums ausgeglichen werden. Die zur Restitution des osmotischen Drucks zuzusetzenden Substanzen wurden mit Hilfe der folgenden Versuchsreihen ausgewählt. Es mußte geklärt werden, ob die veränderte Zusammensetzung die hormonelle Stimulation der Adenylatcyclase der Zelle und die Abgabe von cAMP ins Mediums beeinflusst. NaCl, Glucose, Rohrzucker und meso-Inositol wurden auf ihre Eignung untersucht.

Mit Medium, das anstelle von NaHCO_3 zusätzliches NaCl enthielt, wurden folgende Beobachtungen gemacht (Abb. 41):

- 1) Die Erhöhung des cAMP-Spiegels in Gegenwart von PGE_1 ist im "NaCl-Medium" geringer als im " NaHCO_3 -DMEM".
- 2) Hemmung durch Morphin wurde im " NaHCO_3 -", nicht aber im "NaCl-Medium" beobachtet.
- 3) Die Zellen geben ca. 50 % weniger cAMP ins "NaCl-" als ins " NaHCO_3 -Medium" ab.

Dieser Versuch zeigt die Wichtigkeit von NaHCO_3 im Inkubationsmedium.

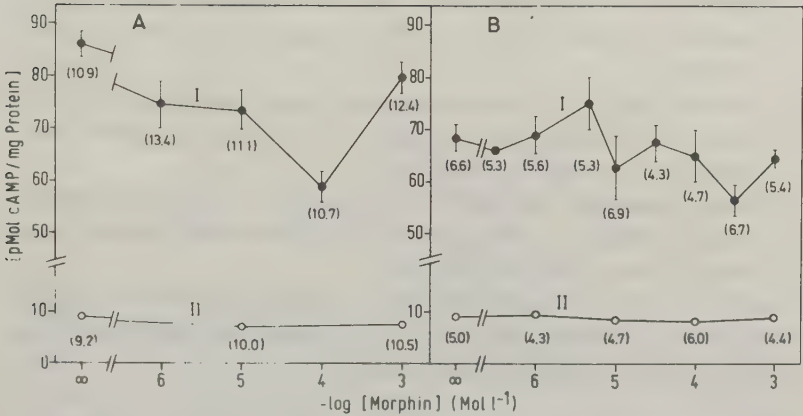


Abb. 41. Abhängigkeit der PGE₁-Wirkung und deren Hemmbarkeit durch Morphin von der Zusammensetzung des Inkubationsmediums. Intrazelluläre cAMP-Spiegel.

A. Kontrollversuch; normales NaHCO₃-haltiges Medium, Endkonzentrationen: 44 mM NaHCO₃, 110 mM NaCl. pH 7,4-7,7; Inkubationszeit 10 min; Inkubation im Inkubator (37°C). Zahlen unter den jeweiligen Meßpunkten geben den prozentualen Anteil der im Medium gefundenen cAMP-Menge an (ausgehend von den Mittelwerten). Kurve I, 3 µM PGE₁, steigende Konzentrationen Morphin; Kurve II, nur Morphin.

B. NaHCO₃ vollständig durch NaCl ersetzt, Endkonzentration 160 mM; pH (7,4 bei Beginn, 7,2 am Schluß der Inkubation) mit 1N NaOH eingestellt, Inkubation auf dem Wasserbad (37°C); sonst wie oben. Kurve I, 3 µM PGE₁ + Morphin; Kurve II, nur Morphin. 5,6x10⁶ lebende Neuroblastomazellen N4TG3 pro Platte, Passage 30, Lebensfähigkeit 99 %.

Ersatz des NaHCO_3 im DMEM durch Glucose (d.h. Erhöhung der Glucosekonzentration auf das 5-fache) führte zu folgenden Beobachtungen (Abb. 42):

- 1) Die Wirkung des PGE_1 ist nicht durch Morphin hemmbar.
- 2) Während in normalem Medium PGE_1 den cAMP-Spiegel stärker anhebt als PGE_2 , sind beide Prostaglandine jetzt gleich wirksam.
- 3) Während $\text{PGF}_{1\alpha}$ in normalem Medium unwirksam ist, erhöht es den cAMP-Spiegel jetzt beträchtlich. $\text{PGF}_{1\alpha}$ steigert die Wirkung von PGE_1 nicht weiter.
- 4) Während NA den cAMP-Spiegel bei Einsatz normalen Mediums senkt, erhöht es ihn jetzt. Die Wirkung des NA ist teilweise additiv zu der des PGE_1 .

Bei hoher Glucosekonzentration verändert sich das Verhalten der Zellen gegenüber Neurohormonen teilweise drastisch. Die Gründe hierfür sind noch unbekannt.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde das NaHCO_3 im DMEM durch Rohrzucker ersetzt. Zum Vergleich dienten NaHCO_3 -haltiges DMEM und DMEM, indem NaHCO_3 durch Glucose oder NaCl ersetzt worden war. Es wurden folgende Ergebnisse erhalten (Abb. 43).

- 1) In Gegenwart von Rohrzucker oder NaCl erhöht PGE_1 den cAMP-Spiegel auf das 3-fache.
- 2) PGE_2 , $\text{PGF}_{1\alpha}$ und NA erhöhen den cAMP-Spiegel nicht.
- 3) Die Ergebnisse bei Verwendung von glucosehaltigem Medium entsprechen denen in Abb. 42.

Für die Inkubation mit Hormonen scheidet Verwendung von Medium mit erhöhtem Glucosegehalt aus den genannten Gründen aus (Abb. 42,43). Ersatz des NaHCO_3 durch NaCl reduziert die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Morphin sehr stark. Da bei diesem Ersatz die Na^+ -Konzentration unverändert bleibt und die Cl^- -Konzentration im DMEM ohnehin schon hoch ist, ist dieser Effekt auf Mangel an HCO_3^- -Ionen zurückzuführen.

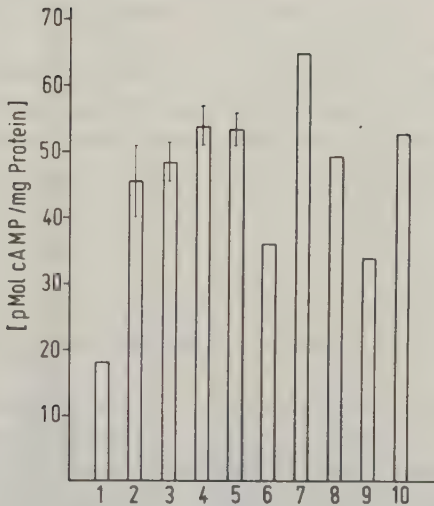


Abb. 42. Ersatz des NaHCO_3 im Inkubationsmedium durch Glucose (Endkonzentration 125 mM) und dadurch bedingte Änderung der Hormonsensitivität von Neuroblastomazellen N4TG3. Intrazelluläre cAMP-Spiegel. Inkubationszeit 10 min. Inkubation nach Einstellen des pH-Wertes mit 1 N NaOH (7,4) auf dem Wasserbad (37°C). Säule 1, ohne Zusätze; Säule 2, $3\text{ }\mu\text{M PGE}_1$; Säule 3, $3\text{ }\mu\text{M PGE}_1$ + $10\text{ }\mu\text{M Morphin}$; Säule 4, $3\text{ }\mu\text{M PGE}_1$ + $100\text{ }\mu\text{M Morphin}$; Säule 5, $3\text{ }\mu\text{M PGE}_1$ + $300\text{ }\mu\text{M Morphin}$; Säule 6, $100\text{ }\mu\text{M NA}$; Säule 7, $3\text{ }\mu\text{M PGE}_1$ + $100\text{ }\mu\text{M NA}$; Säule 8, $3\text{ }\mu\text{M PGE}_2$; Säule 9, $3\text{ }\mu\text{M PGF}_{1\alpha}$; Säule 10, $3\text{ }\mu\text{M PGE}_1$ + $3\text{ }\mu\text{M PGF}_{1\alpha}$. $10,2 \times 10^6$ lebende Zellen pro Platte, Passage 34, Lebensfähigkeit 95 %.

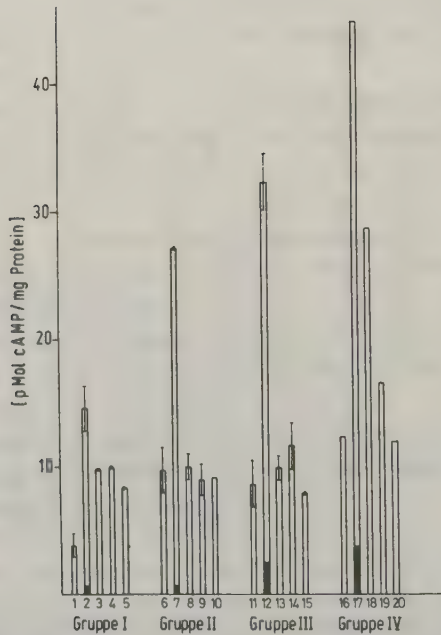


Abb. 43. Einfluß der Zusammensetzung des Inkubationsmediums auf die hormonelle Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels. Bei Säulen 2,7,12,17 auch cAMP-Menge im Medium angegeben (schraffiert). Inkubationszeit 10 min. Gruppe I: Ersatz des NaHCO_3 durch Glucose (Endkonzentration 125 mM), pH mit 1 N NaOH auf 7,2 eingestellt, Inkubation auf dem Wasserbad (37°C). Säule 1, ohne Zusatz; Säule 2, $3 \mu\text{M}$ PGE_1 , schraffierter Teil der Säule: cAMP-Gehalt des Mediums; Säule 3, $3 \mu\text{M}$ PGE_2 ; Säule 4, $3 \mu\text{M}$ $\text{PGF}_{1\alpha}$; Säule 5, $3 \mu\text{M}$ NA. Gruppe II: Ersatz des NaHCO_3 durch Rohrzucker (Endkonzentration 100 mM), sonst wie Gruppe I. Säulen 6-10 entsprechen 1-5 von Gruppe I. Gruppe III: Ersatz des NaHCO_3 durch NaCl (Endkonzentration 160 mM), sonst wie Gruppe I. Säulen 11-15 entsprechen 1-5 von Gruppe I. Gruppe IV: Normales DMEM mit vollen NaHCO_3 -Gehalt. Endkonzentrationen: 44 mM NaHCO_3 , 25 mM Glucose, 110 mM NaCl, pH um 8,0. Inkubation im Inkubator (37°C). Säulen 16-20 entsprechen Säulen 1-5 von Gruppe I. $4,6 \times 10^6$ lebende Neuroblastomazellen N4TG3 pro Platte, Passage 27, Lebensfähigkeit 96 %.

Bei Senkung des NaHCO_3 -Gehalts im DMEM um $1/3$ lassen sich die pH-Schwankungen auf maximal 0,3 pH-Einheiten verringern. Der osmotische Druck wird durch NaCl eingestellt. Mit dieser Mischung ("Inkubationsmedium"), das zeigen die Versuche in dieser Arbeit, kann die Wirkung von Morphin und anderen Zusätzen ohne Schwierigkeiten beobachtet werden. Eine detaillierte Anleitung zur Verwendung dieses Mediums wird in Kapitel C.IV.2. gegeben.

3. Einflüsse von Serum und Mediumwechsel.

Die Inkubation der Zellen mit Hormonen kann auf verschiedene Weise ausgeführt werden.

- 1) Hormonlösung direkt ins Wachstumsmedium pipettieren.
- 2) Wachstumsmedium entfernen; Zellen mit Inkubationsmedium waschen und Inkubationsmedium zusetzen; Hormonlösung sofort ins Inkubationsmedium pipettieren und 10 min inkubieren.
- 3) Wachstumsmedium entfernen; Zellen mit Inkubationsmedium waschen und Inkubationsmedium zusetzen; Zellen längere Zeit (1-6 h) im Inkubationsmedium stehen lassen; dann erst Hormonlösung zugeben und 10 min inkubieren.

Bei einem Vergleich der Methoden 1) und 2) wurden Hybridzellen mit steigenden Mengen Morphin in An- und Abwesenheit von PGE_1 inkubiert (Abb. 44). Während nach Methode 2 starke Erhöhung des cAMP-Spiegels in Gegenwart von PGE_1 , partielle Hemmung des PGE_1 -Effekts durch Morphin und Verlust der Hemmung bei hohen Morphinkonzentrationen beobachtet werden, findet man nach Methode 1 vergleichsweise starke Verringerung der Stimulierung durch PGE_1 und der Hemmung durch Morphin sowie keinen Verlust der Hemmung bei hohen Morphinkonzentrationen.

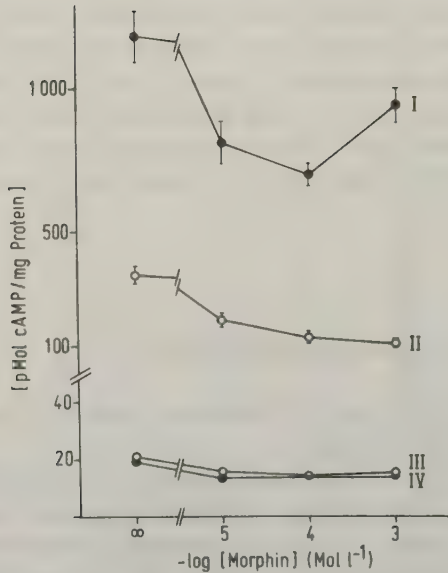


Abb. 44. Einfluß des Mediumwechsels auf die Erhöhung intrazellulärer cAMP-Spiegel durch PGE_1 und auf die Hemmbarkeit der PGE_1 -Wirkung durch Morphin. Inkubationszeit 10 min. DMEM mit vollem NaHCO_3 -Gehalt (aus Vergleichsgründen mußte auf die Verwendung von Inkubationsmedium verzichtet werden). Inkubation im Inkubator (37°C). Kurve I, Mediumwechsel direkt vor der Inkubation mit $3 \mu\text{M}$ PGE_1 und steigenden Konzentrationen Morphin. Kurve II, PGE_1 bzw. PGE_1 + Morphin direkt ins Wachstumsmedium pipettiert; Kurve III wie II, jedoch ohne PGE_1 ; Kurve IV wie I, jedoch ohne PGE_1 . $2,8 \times 10^6$ lebende Hybridzellen 108CC15 pro Platte, Passage 14.

Die verminderte Stimulierbarkeit durch PGE_1 in Gegenwart von Wachstumsmedium ist wahrscheinlich auf zweierlei Faktoren zurückzuführen: 1) Von den Zellen ausgeschiedene(r) Faktor(en), z.B. AcCh. Ein Hinweis dafür ist, daß in einem Fall PGE_1 den cAMP-Spiegel erst dann auf den normal hohen Wert anhob, wenn Atropin zugegen war (siehe Tab. 20). 2) Faktor(en) aus FCS. FCS sowie Seren anderer Tiere verhinderten die durch PGE_1 ausgelöste Erhöhung des cAMP-Spiegels (210). Über den Wirkungsmechanismus dieser Faktoren ist nichts bekannt.

Aus dieser Untersuchung folgt, daß für die Inkubation serumfreies Medium verwendet werden muß.

Als nächstes wurden Methoden 2) und 3) verglichen, um zu erfahren, ob es günstig ist, den Zellen zwischen Zugabe des Inkubationsmediums und Zugabe des Hormons Zeit zu geben, sich der neuen Umgebung anzupassen (Tab. 15). In Experiment 1 und 2 nimmt die Stimulierbarkeit durch PGE_1 ab, wenn man die Zeitspanne zwischen Mediumwechsel und Zugabe des Hormons (Inkubationsbeginn) ausdehnt. In Experiment 3 ist dies zunächst auch der Fall. Die Abnahme der Stimulierbarkeit durch PGE_1 kann wahrscheinlich auf die Zunahme der AcCh-Konzentration im Medium (und dadurch unterdrücktes Ansprechen auf PGE_1) zurückgeführt werden. Nach 3 bzw. 6 h (Experiment 3) nimmt die Stimulierbarkeit wieder zu. Dies könnte auf den später zu besprechenden Langzeiteffekt des AcCh zurückzuführen sein (siehe Kapitel B.V.1 und 3.).

Das Ausmaß der Morphinhemmung der Prostaglandinwirkung zeigt keinen eindeutigen Gang mit dem Zeitabstand zwischen Mediumwechsel und Inkubationsbeginn.

Aufgrund dieser Versuche scheint es ratsam zu sein, die Hormoninkubation direkt nach dem Mediumwechsel zu beginnen. Im allgemeinen wurde in dieser Arbeit so verfahren.

Tab. 15. Die Stimulierbarkeit durch PGE_1 und die Hemmbarkeit durch Morphin sind abhängig vom Zeitpunkt des Inkubationsbeginns nach Mediumwechsel. Einfluß auf die Hemmbarkeit durch Morphin.

Experiment Nr.	Zeit* (h)	PGE_1 3 μM	PGE_1 3 μM Morphin 1 μM	PGE_1 3 μM Morphin 10 μM	PGE_1 3 μM Morphin 100 μM
1	0	1190 $\pm$ 110	1030 $\pm$ 110	651 $\pm$ 5	541 $\pm$ 16
	6	802 $\pm$ 1	-	405 $\pm$ 40	294 $\pm$ 4
2	0	1680 $\pm$ 130	-	-	810
	3	1520 $\pm$ 60	-	-	670 $\pm$ 64
	5	1200 $\pm$ 100	-	-	570 $\pm$ 11
3	0	748 $\pm$ 19	-	-	510 $\pm$ 23
	1	455 $\pm$ 21	-	-	103 $\pm$ 3
	3	493 $\pm$ 18	-	-	210 $\pm$ 17
	6	603 $\pm$ 24	-	-	125 $\pm$ 14

* Zeit zwischen Mediumwechsel und Inkubationsbeginn.

Inkubation in Inkubationsmedium (10 min). Hybridzellen 108CC15.

Experiment Nr.	lebende Zellen pro Platte $\times 10^{-6}$	Passage	Lebensfähigkeit (%)
1	2,4	12	96
2	1,7	16	92
3	3,1	12	98

V. Studien zur Langzeitwirkung von Opiaten und Neurotransmittern. Biochemische Korrelate für Morphintoleranz, -abhängigkeit und -entzugssyndrom.

Die Entwicklung von Toleranz und physischer Abhängigkeit nach wiederholtem Genuß ist ein Charakteristikum aller Opiate (155). Dies ist gleichzeitig eine der Haupteinschränkungen für den klinischen Gebrauch. Der plötzliche Entzug einer solchen Droge nach Entwicklung physischer Abhängigkeit ist gekoppelt mit einer akuten Verschlechterung des Wohlbefindens der betroffenen Person (155). Wir hatten gesehen, daß akute Wirkungen von Opiaten mit Veränderungen der Spiegel cyclischer Nucleotide verknüpft sind. Es stellten sich die Fragen: 1) Ob auch die chronischen Wirkungen von Opiaten und Narkotica mit unserem Zellkultursystem untersucht werden könnten und 2) ob Veränderungen in ihrem biochemischen Verhalten korreliert werden könnten mit Erscheinungen wie Drogentoleranz, -abhängigkeit und -entzugssyndrom. Die Ähnlichkeit der Kurzzeiteffekte von Opiaten, adrenergen und cholinergen Neurotransmittern sollte unter Umständen auch analoge Langzeitwirkungen erwarten lassen.

1. Langzeitinkubationen mit morphinähnlichen Substanzen, cholinergen und adrenergen Agonisten.

Replikaplaten mit Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen wurden unterschiedlich lange mit Wachstumsmedium inkubiert, das 10 μ M Morphin enthielt (Vorinkubation). Nach Entfernung des Wachstumsmediums wurde einmal mit Inkubationsmedium gewaschen; dann wurde Inkubationsmedium zugegeben. Die Zellen wurden sofort in An- und Abwesenheit von Morphin 10 min lang mit PGE₁ inkubiert (Hauptinkubation). Mehrstündig mit Morphin vorbehandelte Zellen sprechen auf PGF mit einer stärkeren Erhöhung des cAMP-Spiegels an als morphinfrei vorinkubierte Vergleichszellen (Abb. 45, Kurve I). Nach 17 h Vorinkubationszeit hat

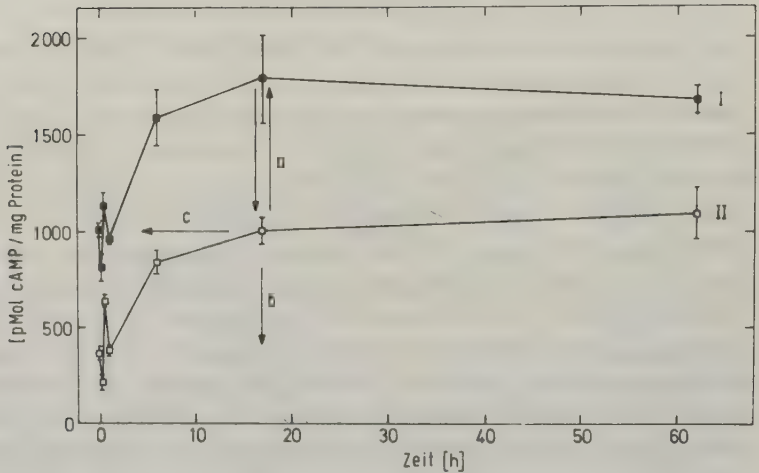


Abb. 45. Zeitlicher Verlauf der Entwicklung des erhöhten Ansprechens auf PGE_1 während der Vorbehandlung der Hybridzellen 108CC15 mit $10 \mu\text{M}$ Morphin. Nach den durch die Meßpunkte angegebenen Vorinkubationszeiten wurde das morphinhaltige Medium entfernt, der Zellrasen einmal mit Inkubationsmedium gewaschen und anschließend 10 min bei 37°C mit $3 \mu\text{M}$ PGE_1 (Kurve I) oder $3 \mu\text{M}$ PGE_1 + $100 \mu\text{M}$ Morphin (Kurve II) inkubiert. Messung intrazellulärer cAMP-Spiegel. $3,6 \times 10^6$ lebende Zellen pro Platte, Passage 8, Lebensfähigkeit 95 %.

die Stimulierbarkeit durch PGE_1 ein Plateau erreicht, das je nach Versuch einer Zunahme von 60 bis 100 % entspricht. Unabhängig von der Dauer der Vorinkubationszeit mit Morphin (0 - 62 h) ist der Effekt des PGE_1 auf den cAMP-Spiegel stets durch Morphin hemmbar (Kurve II). Morphin ist in diesem Falle

also während Vor- und Hauptinkubation anwesend. Die gesteigerte Reaktion der Zellen auf PGE_1 kann es jedoch nicht kompensieren.

Setzen wir nun die Hybridzelle als Modell einer morphinempfindlichen Zelle im Gehirn. Nehmen wir an, daß der cAMP-Spiegel, der durch den ersten Meßpunkt von Kurve I (Abb. 45) angegeben wird, dem Normalbefinden eines Menschen oder Tieres entspricht, und daß der erste Meßpunkt von Kurve II besonderem Wohlbefinden nach Morphingenuß entspricht. Dann kann man annehmen, daß eine Erhöhung des cAMP-Spiegels eine Verringerung des Wohlbefindens bis hin zu ausgesprochen unangenehmen Empfindungen bedeutet. Wenn nach chronischer Morphingabe und anschließendem Entzug des Opiats eine konstante Menge PGE_1 einen höheren cAMP-Spiegel als vor der Morphinbehandlung hervorruft, dann bedeutet dies erhöhtes Mißbehagen (Abb. 45, Kurve I, z.B. $t = 17$ h). Mißbehagen kann in Normalbefinden umgewandelt werden, wenn man Morphin gibt (Übergang von Kurve I auf Kurve II bei z.B. $t = 17$ h, Pfeil a). Um ausgesprochenes Wohlbefinden zu erzeugen, muß jetzt sogar mehr Morphin gegeben werden (Morphintoleranz) als bei $t = 0$ (Pfeil b). Umgekehrt entspricht der Übergang von Kurve II auf I bei z.B. $t = 17$ h einem Entzugssyndrom (Pfeil a). Auch die Drogenabhängigkeit läßt sich leicht an Hand des Modells erklären. Nach z.B. 17 h Vorinkubation mit Morphin wird nach Stimulation mit PGE_1 in Gegenwart von Morphin praktisch derselbe cAMP-Spiegel erreicht, der erreicht wird, wenn die Zellen niemals vorher Morphin gesehen haben (Übergang von Kurve II auf I, Pfeil c). Sobald die Zellen sich an Morphin gewöhnt haben, also "süchtig" sind, wird immer eine bestimmte Menge Morphin benötigt, um wenigstens den cAMP-Spiegel zu erreichen, der Normalbefinden entspricht. Andernfalls schnellt der cAMP-Spiegel auf Werte, die Mißbehagen entsprechen.

Die Entwicklung eines gesteigerten Ansprechens auf PGE_1 hängt von der Morphinkonzentration während der Vorinkubationsperiode

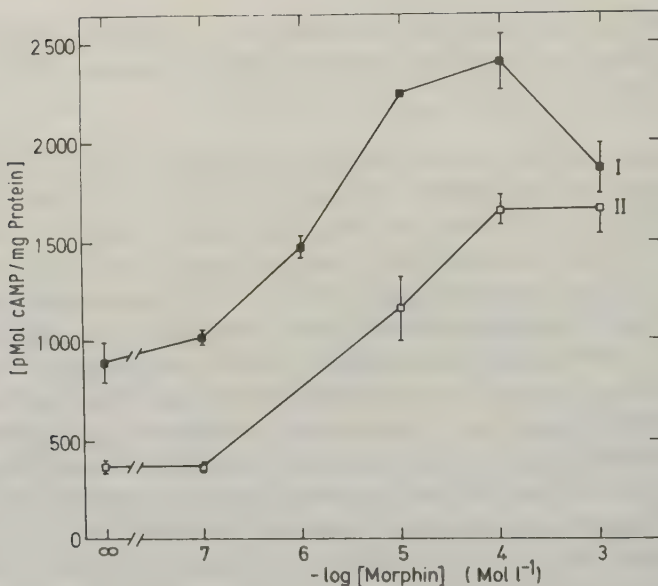


Abb. 46. Beziehung zwischen der Morphinkonzentration während der 15-stündigen Vorinkubationsperiode und dem Ansprechen auf PGE_1 während der 10-minütigen Hauptinkubation. Bezeichnung der Kurven und weitere Details siehe Abb. 45. $3,0 \times 10^6$ lebende Hybridzellen 108CC15 pro Platte, Passage 9, Lebensfähigkeit 99 %.

(15 h) ab (Abb. 46). Der Effekt steigt von 0,1 bis 100 μM Morphin und sinkt bei sehr hoher Konzentration (1mM) wieder ab (Kurve I). Unabhängig von der Morphinkonzentration während der Vorinkubation ist die Wirkung des PGE_1 während der Hauptinkubation durch gleichzeitig anwesendes Morphin (100 μM) hemmbar. Dies gilt nicht, wenn die Morphinkonzentration während der Vorinkubationsperiode 1 mM ist. Aufgrund des Abfalls in der Stimulierbarkeit durch PGE_1 geht auch die akute

Hemmbarkeit des PGE_1 -Effektes durch Morphin verloren (Kurve II). Die Vorinkubation mit Morphin steigert nicht nur die Reaktion der Zellen auf PGE_1 , sondern vermutlich auf alle Agentien, die den cAMP-Spiegel anheben. Für Adenosin jedenfalls wurde dies nachgewiesen (Tab. 16).

Tab. 16. Vorinkubation der Hybridzellen 108CC15 mit Morphin erhöht deren Reaktion auf PGE_1 und Adenosin.
 $1,8 \times 10^6$ lebende Zellen pro Platte, Passage 13,
 Lebensfähigkeit 97 %.

Hauptinkubation (10 min)	Konzentration (μM)	Vorinkubation (15 h) cAMP (pMol/mg Protein)	
		ohne Zusatz	Morphin ($10 \mu\text{M}$)
ohne Zusatz	-	18 ± 3	24 ± 2
Morphin	100	20 ± 1	25 ± 2
PGE_1	3	777 ± 47	1170 ± 110
PGE_1 + Morphin	3, 100	290 ± 4	634 ± 25
Adenosin	10	160 ± 12	328 ± 9

Wegen ihrer gleichartigen Kurzzeitwirkung sollten Morphin und andere Opiate (Levorphanol) bzw. Narkotica (Methadon) sowie NA und AcCh ähnliche Langzeiteffekte hervorrufen (Tab. 17). Aufgrund des raschen Abbaus von AcCh und NA in den Kulturen wurden allerdings deren stabile Analoga Carbamylcholin und Isoproterenol verwendet. Wird der β -adrenerge Agonist Isoproterenol in ausreichender Konzentration eingesetzt, wirkt er auch über die α -adrenergen Rezeptoren (Abb. 32). PGE_1 steigert den cAMP-Spiegel in Zellen, die mit Isoproterenol oder Carbamylcholin vorbehandelt wurden, auf 5 - bzw. 2-fach höhere Werte als in unbehandelten Zellen. Bei Zellen, die mit Dextrorphan oder Naloxon vorbehandelt wurden, wird keine verstärkte, son-

Tab. 17. Einfluß der Vorinkubation von Hybridzellen 108CC15 mit verschiedenen Drogen und deren Wirkung auf die PGE_1 - und Morphineffekte.

Vorinkubation mit ^a	Zugabe für die Hauptinkubation							
	Experiment 1				Experiment 2			
	C	M	P ^c	P ^c + M ^b cAMP (pMol / mg Protein)	C	M ^b	P ^c	P ^c + M ^b
C	19	14	910 [±] 8	436 [±] 25	38 [±] 5	38 [±] 8	1310 [±] 50	338 [±] 51
M	16	-	1280 [±] 60	874 [±] 92	57 [±] 5	45 [±] 5	2540 [±] 230	1220 [±] 20
D	12	23	818 [±] 49	269 [±] 25	50	28 [±] 3	1200 [±] 50	355 [±] 4
L	-	12	871 [±] 21	832 [±] 67	35 [±] 2	38 [±] 1	847 [±] 62	1010 [±] 120
Me	39	14	942 [±] 58	853 [±] 42	39 [±] 4	45 [±] 3	2440 [±] 140	2240 [±] 120
N	21	14	698 [±] 61	328 [±] 36	-	-	-	-
I	-	-	-	-	60	45 [±] 1	5620 [±] 100	2880 [±] 450
Ca	-	-	-	-	80	54 [±] 3	2560 [±] 60	990 [±] 86

^a Alle Konzentrationen 10 μ M; ^b 100 μ M; ^c 3 μ M.

C, Kontrolle, keine Zusätze; M, Morphin; P, PGE_1 ; D, Dextrorphan; L, Levorphanol; Me, L-Methadon; N, Naloxon; I, D,L-Isoproterenol; Ca, Carbamylcholin. Inkubationsbedingungen siehe Abb. 45. Experiment 1: Vorinkubationszeit 15 h, $2,2 \times 10^6$ lebende Zellen pro Platte, Passage 10, Lebensfähigkeit 98 %. Experiment 2: Vorinkubationszeit 36 h, $4,4 \times 10^6$ lebende Zellen pro Platte, Passage 9, Lebensfähigkeit 99 %.

dern eher eine abgeschwächte Reaktion auf PGE_1 festgestellt. Auch nach 36 h Vorinkubation der Zellen mit 10 μ M Methadon erhöht PGE_1 den cAMP-Spiegel auf Werte, die um fast 100 % höher liegen als die der Kontrollen. Überraschenderweise zeigt das Morphin-Analogon Levorphanol keine derartige Wirkung. Man beobachtet vielmehr vermindertes Ansprechen auf PGE_1 . Die erhöhte Reaktion auf PGE_1 von Zellen, die mit Morphin, Isopro-

terenol oder Carbamylcholin vorbehandelt wurden, ist durch jede der drei Verbindungen hemmbar (Daten nur für Morphin gezeigt, Tab. 17). Bemerkenswert ist, daß 100 µM Morphin den PGE₁-Effekt nicht in Zellen hemmt, die mit 10 µM Methadon oder 10 µM Levorphanol vorinkubiert wurden. Diese Erscheinung, die uns bei mit 1 mM Morphin vorbehandelten Zellen aufgefallen war (Abb. 46), wurde weiter analysiert.

Tab. 18. Einfluß der Vorinkubation von Hybridzellen 108GC15 mit verschiedenen Drogen auf die Wirkung von PGE₁, Opiaten und NA. 6,2x10⁶ lebende Zellen pro Platte, Passage 10, Lebensfähigkeit 95 %.

Hauptinku- bation (10min)	Konzentra- tion (µM)	Vorinkubation (15h) cAMP (pMol/mg Protein)			
		ohne Zu- satz	Morphin (10µM)	Methadon (10 µM)	Levorpha- nol (10µM)
Ohne Zusatz	-	12	24	17	13
Morphin	100	12	24	21	13
Levorphanol	100	10	23	16	11
NA	0,1	7	13	11	8
PGE ₁	3	615 [±] 22	1360 [±] 170	1490 [±] 80	596 [±] 36
PGE ₁ + Morphin	3, 10	-	-	1950 [±] 70	-
	3, 100	162 [±] 23	522 [±] 28	1720 [±] 110	826 [±] 20
	3, 1000	-	-	1760 [±] 120	-
PGE ₁ + NA	3, 0,1	34 [±] 3	140 [±] 10	308 [±] 6	155 [±] 1
PGE ₁ + Morphin + NA	3, 100, 0,1	23 [±] 1	96 [±] 1	150 [±] 5	45 [±] 6
PGE ₁ + Levorphanol	3, 10	76 [±] 7	684 [±] 26	1390 [±] 110	588 [±] 25
	3, 100	81 [±] 13	927 [±] 59	1640 [±] 110	712 [±] 69

Tab. 18 zeigt, daß bei Zellen, die mit Methadon oder Levorphanol 15 h lang vorbehandelt worden waren, der PGE₁-Effekt zwar durch NA, nicht aber durch Morphin hemmbar ist. In einer Konzentration von 100 µM verstärken die beiden Opiate die Wirkung

des PGE_1 sogar.

Eine Reihe von Gründen ließen vermuten, daß Hemmbarkeit durch Morphin auch in mit Levorphanol oder Methadon vorbehandelten Zellen gefunden würde, wenn die Drogen-Konzentrationen während der Vorinkubation niedrig gewählt würden. Abb. 47 zeigt aber, daß 100 μM Morphin auch in jenen Zellen nur wenig hemmt, die mit niedrigen ($< 1 \mu\text{M}$) Konzentrationen von Levorphanol vorinkubiert wurden. Wir haben Grund zu der noch zu prüfenden Annahme, daß Morphin in niedrigeren Konzentrationen während der Hauptinkubation ($< 100 \mu\text{M}$) den PGE_1 -Effekt deutlich gehemmt hätte. Der Versuch ist ferner ein Beispiel dafür, daß auch Vorinkubation mit Levorphanol erhöhtes Ansprechen zur Folge haben kann. Schließlich ist bemerkenswert, daß PGE_1 den cAMP-Spiegel nur noch geringfügig anhebt, wenn millimolar Levorphanol während der Vorinkubation zugegen war. Dies trifft in abgeschwächtem Maße auch für Zellen zu, die mit Morphin (Abb. 46) bzw. Methadon (Abb. 48) vorbehandelt wurden.

Entsprechend oben geäußerter Vermutung - und im Gegensatz zu der Untersuchung mit Levorphanol - ist die Wirkung von PGE_1 durch Morphin hemmbar, wenn man während der Vorinkubation Methadon in niedriger Konzentration einsetzt (Abb. 48). Für den anfänglichen Abfall der Kurven in Abb. 48 haben wir keine Erklärung.

Als Modellsubstanzen zur Untersuchung der biochemischen Korrelate von Opiatabhängigkeit, - toleranz und - entzugssyndrom an den Hybridzellen eignen sich bisher nur Isoproterenol, Carbamylcholin und Morphin. Als weniger geeignet hingegen erscheinen Levorphanol und Methadon, so lange, bis einige nur bei diesen und nicht bei den anderen Substanzen beobachtete Phänomene aufgeklärt sind.

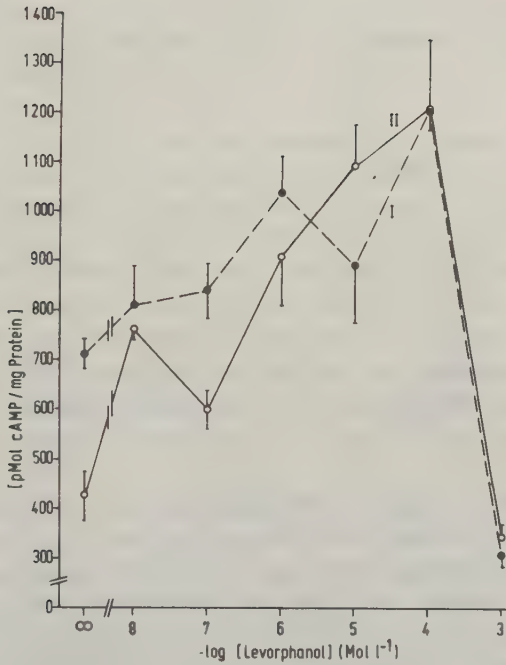


Abb. 47. Einfluß der Levorphanol-Konzentration während der Vorinkubationsperiode auf das Verhalten der Zellen gegenüber PGE₁ und Morphin während der Hauptinkubation. Vorinkubationszeit 15 h.

Hauptinkubation (10 min) in Gegenwart von 3 μM PGE₁ (Kurve I) oder PGE₁ + 100 μM Morphin (Kurve II). 2,5x10⁶ lebende Hybridzellen 108CC15 pro Platte, Passage 18, Lebensfähigkeit 98 %.

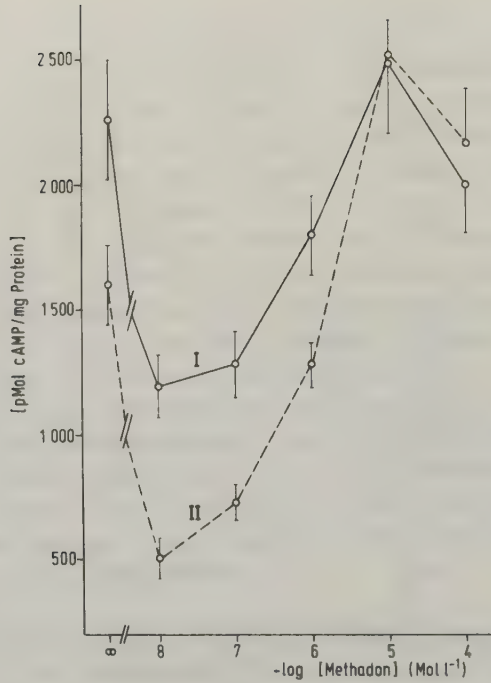


Abb. 48. Einfluß der Methadon-Konzentration während der Vorinkubationsperiode auf das Verhalten der Zellen gegenüber PGE_1 und Morphin während der Hauptinkubation. Vorinkubationszeit 15 h.

Hauptinkubation (10 min) in Gegenwart von $3 \mu\text{M}$ PGE_1 (Kurve I) oder $\text{PGE}_1 + 100 \mu\text{M}$ Morphin (Kurve II). $2,6 \times 10^6$ lebende Hybridzellen 108CC15 pro Platte, Passage 17, Lebensfähigkeit 99 %.

2. Weitere Eigenschaften morphinvorbehandelter Zellen.
Ändern morphinvorbehandelte Zellen ihre Sensitivität
gegenüber PGE₁ und Morphin?

Um den ersten Teil der Frage zu beantworten, wurden Hybridzellen 15 h lang mit 10 μ M Morphin oder Methadon vorbehandelt. Nach Entfernen der Droge wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an PGE₁ 10 min inkubiert, bevor der cAMP-Spiegel gemessen wurde (Abb. 49). In Bestätigung der bereits beschriebenen Versuche sprechen mit Methadon (Kurve II) und Morphin vorbehandelte Zellen (Kurve I) auf steigende Konzentrationen PGE₁ bedeutend stärker an als unbehandelte Zellen (Kurve III). Die EC50-Werte für PGE₁ von vorbehandelten und nicht vorbehandelten Zellen sind bis auf den Faktor 2-3 gleich.

Um den zweiten Teil der obengestellten Frage zu beantworten, wurden unbehandelte und mit Morphin vorbehandelte Hybridzellen bei gleicher PGE₁- mit steigender Morphin-Konzentration 10 min lang inkubiert (Abb. 50). Die erhöhte Stimulierbarkeit vorbehandelter Zellen durch PGE₁ zeigt sich auch hier wieder. Die IC50-Werte für die Hemmung des PGE₁-Effektes durch Morphin ändern sich nicht durch die Vorbehandlung.

Die beiden Versuche zeigen, daß Vorbehandlung mit Narkotica keine wesentlichen Änderungen der Empfindlichkeit gegenüber PGE₁ (Abb. 49) und Morphin (Abb. 50) verursacht. Diese wichtige Beobachtung bedeutet, daß die Rezeptorbindungskonstanten von PGE₁ und Morphin nicht wesentlich verändert sind. Da die Empfindlichkeit gegenüber Morphin bei hohen PGE₁-Konzentrationen gemessen wurde, kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß sich bei niedrigem cAMP-Spiegel die Morphin-Empfindlichkeiten unbehandelter und behandelter Zellen stark unterscheiden. Sollte dies jedoch nicht zutreffen, so könnte man schließen, daß Morphintoleranz und -abhängigkeit nichts zu tun haben mit veränderter Sensitivität der Zellen gegen-

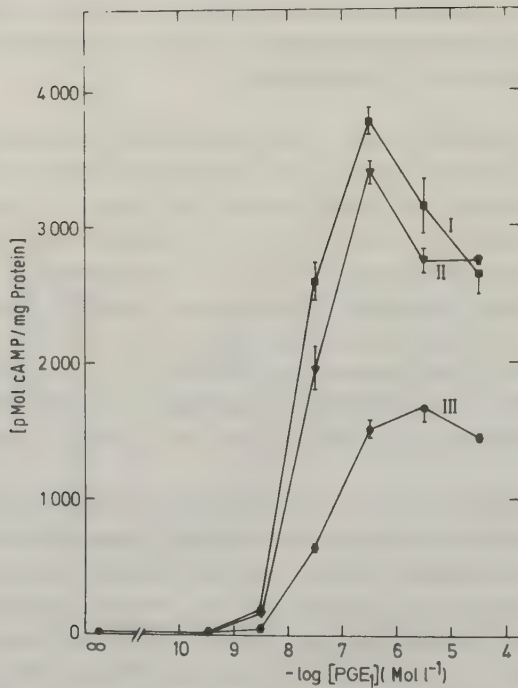


Abb. 49. PGE₁-Sensitivität von Hybridzellen 108CC15 nach Langzeitbehandlung mit Morphin oder Methadon. Kurve I, Behandlung mit 10 μ M Morphin (15 h); Kurve II, wie I, jedoch Methadon; Kurve III, keine Vorbehandlung. $2,5 \times 10^6$ lebende Zellen pro Platte, Passage 9, Lebensfähigkeit 99 %.

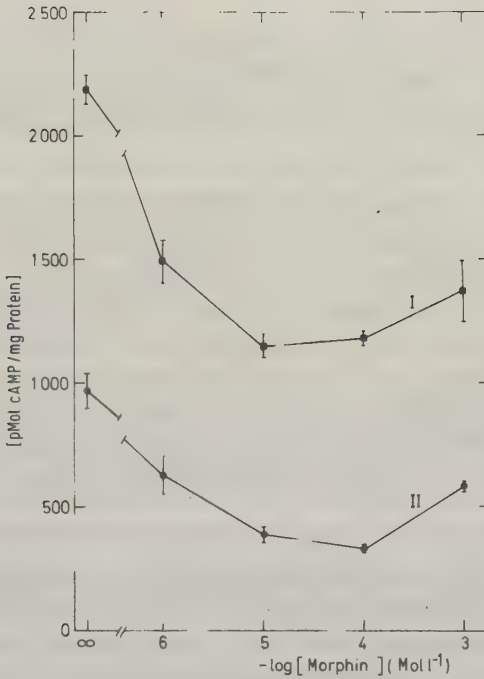


Abb. 50. Sensitivität von Hybridzellen 108CC15 gegenüber Morphin nach Langzeitinkubation mit Morphin. Kurve I, Zellen 15 h mit $10 \mu\text{M}$ Morphin vorinkubiert, dann Stimulation mit $3 \mu\text{M}$ PGE_1 in Anwesenheit steigender Konzentrationen Morphin. Kurve II, keine Vorbehandlung, sonst wie I. $1,3 \times 10^6$ lebende Zellen pro Platte, Passage 12, Lebensfähigkeit 98 %.

über Morphin oder PGE_1 . Inzwischen wurde in vivo (211) und an Hybridzellen (80) gezeigt, daß sich auch die Zahl der Morphinrezeptoren bei Langzeitbehandlung mit Morphin nicht ändert.

Um die Frage zu beantworten, ob Proteinbiosynthese an der Entwicklung der Langzeiteffekte beteiligt ist, wurden die Zellen 7 h mit 10 μM Morphin in Ab- und Anwesenheit von Cycloheximid (1 bzw. 10 μM) vorinkubiert. Danach wurde die Hauptinkubation (10 min) durch Zusatz von PGE_1 oder PGE_1 + 100 μM Morphin eingeleitet (Tab. 18). Der übliche Mediumwechsel am Ende der Vorinkubationsmethode war aus technischen Gründen nicht möglich. Mit Cycloheximid behandelte Zellen haften nur noch lose an der Kulturschale und würden bei Mediumwechsel abgeschwemmt werden.

Tab. 18. Einfluß von Cycloheximid auf die Entwicklung von Langzeiteffekten bei Morphinvorinkubation. Inkubationsbedingungen siehe Text. Werte in pMol cAMP/mg Protein. $3,1 \times 10^6$ lebende Hybridzellen 108CC15 pro Platte, Passage 12, Lebensfähigkeit 98 %.

Konzentration von Morphin (μM) während Vorinku- Haupt- bation inkuba- tion (7h) (10min)		Cycloheximid (μM)					
		0		1		10	
		ohne PGE_1	mit (3 μM)	ohne PGE_1	mit (3 μM)	ohne PGE_1	mit (3 μM)
0	0	16 $\pm$ 1	1730 $\pm$ 70 (a)	13 $\pm$ 1	1810 $\pm$ 140	4 $\pm$ 1	1770 $\pm$ 170 (e)
0	100	13 $\pm$ 3	780 $\pm$ 70 (b)	10 $\pm$ 2	1120 $\pm$ 120	6	1040 $\pm$ 130 (f)
10	10	29	3140 $\pm$ 160 (c)	10 $\pm$ 1	3150 $\pm$ 240	7 $\pm$ 2	1650 $\pm$ 170 (g)
10	110	14	2550 $\pm$ 180 (d)	11 $\pm$ 1	1960 $\pm$ 10	5 $\pm$ 1	1370 $\pm$ 140 (h)

Vorinkubation mit Morphin erzeugt in gewohnter Weise erhöhte Reaktion der Zellen auf PGE_1 (Werte c und a). Es ist zu berücksichtigen, daß Wert c wegen der Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ Morphin niedriger ist als der hier nicht meßbare Wert, der in Abwesenheit von Morphin (Hauptinkubation) erhalten worden wäre. Ca. $100 \mu\text{M}$ Morphin hemmt den PGE_1 -Effekt in Zellen, die mit oder ohne Morphin vorinkubiert wurden (Werte d und b). Cycloheximid ($10 \mu\text{M}$) verhindert die durch Morphin verursachte Entwicklung der verstärkten Reaktion auf PGE_1 (Werte c, e und g bzw. d, f und h).

Der Versuch zeigt also, daß ungehemmte Proteinbiosynthese für die Entwicklung biochemischer Korrelate für Morphintoleranz, -abhängigkeit und -entzugssyndrom notwendig ist. Diese Interpretation erscheint nicht zu weit hergeholt. In Tierversuchen verhindert Cycloheximid nämlich ebenfalls die Entstehung von Morphintoleranz etc. (212-214). Es muß noch geklärt werden, welche Proteine für die Entstehung des Toleranzphänomens wichtig sind.

Nach Langzeitinkubation mit Morphin sprechen die Hybridzellen verstärkt auf PGE_1 an (Abb. 45). Bleibt dieser Effekt erhalten oder geht er allmählich wieder verloren, wenn man das Morphin am Ende der Langzeitinkubation absetzt? Um diese Frage zu beantworten, wurde zu verschiedenen Zeiten nach Entfernung des Morphins 10 min lang mit PGE_1 inkubiert. Abb. 51, Kurve I, zeigt, daß mit zunehmender Zeit nach Absetzen des Morphins die Erhöhung des cAMP-Spiegels durch PGE_1 immer geringer ausfällt. Nach 3 h verhalten sich die Zellen wieder wie solche, die nicht mit Morphin behandelt worden sind (Kurve II). Sie haben ihre Vergangenheit "vergessen". Wichtig ist, daß selbst nach kurzzeitigem Absetzen des Morphins die erhöhte Stimulierbarkeit verringert wird. Zur Aufrechterhaltung der erhöhten Stimulierbarkeit ist also die permanente Anwesenheit von

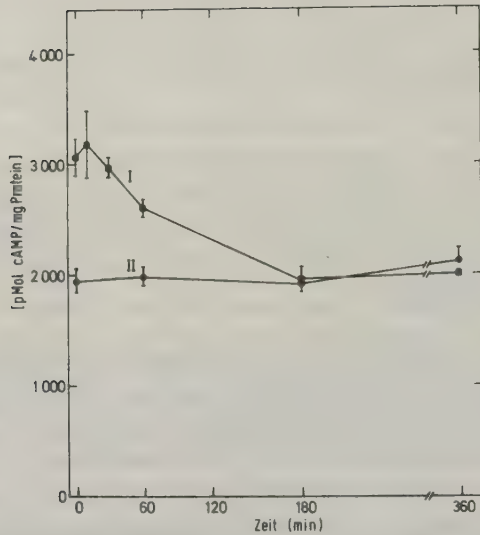


Abb. 51. Verlust der erhöhten Reaktion auf PGE_1 nach Entfernung des Morphins bei 15 h lang mit Morphin vorbehandelten Hybridzellen 108CC15 (Kurve I). Tausch des morphinhaltigen Wachstumsmediums gegen morphinfreies Inkubationsmedium. Zu verschiedenen Zeiten danach 10-minütige Inkubation mit $3 \mu\text{M}$ PGE_1 . Kurve II, nicht vorbehandelte Kontrollzellen. $2,7 \times 10^6$ lebende Zellen pro Platte, Passage 13, Lebensfähigkeit 99 %.

Morphin (Carbamylcholin, Isoproterenol) notwendig.

Es muß noch geklärt werden, ob dieser Vorgang von Proteinbiosynthese abhängig ist.

3. Wie hängen akute und chronische Wirkungen von Opiaten und Neurotransmittern zusammen? Modellvorstellungen und Versuche.

Bei Applikation von Morphin, NA oder AcCh (Ligand L) auf die Oberfläche der Hybridzellen ist das wichtigste Ereignis deren Bindung an den zugehörigen Rezeptor R. Dies hat vermutlich Veränderungen in der Struktur des Rezeptors zur Folge, die wahrscheinlich zu Änderungen in der Membranstruktur führen (ΔStr). Diese wiederum haben Änderungen der Ionenpermeabilitäten (Δg) zur Folge, die zu den frühest nachweisbaren Ereignissen führen, der Änderungen des Membranpotentials (ΔU) und der intrazellulären Ionenkonzentrationen (ΔC_I). Als nächstes bemerkt man die Änderungen der Aktivitäten (ΔA) der Purylatcyclasen (Sammelbegriff für Adenylat- und Guanylatcyclase) an der Änderung der Konzentration der cyclischen Nucleotide (ΔC_{cNMP}). Schließlich, nach vielen Stunden, findet man das erhöhte Ansprechen der Zellen auf PGE_1 (Toleranz T). Wie verläuft die Kausalkette? Etwa wie in Abb. 52 A, wo eine Änderung der Konzentration der cyclischen Nucleotide Voraussetzung ist für das Auftreten des Langzeiteffektes T; oder wie in Abb. 52 B, wo die kurzfristige Änderung der Ionenkonzentration C_I in der Zelle den Langzeiteffekt T bedingt, die Änderung der cyclischen Nucleotidspiegel (ΔC_{cNMP}) aber nur ein zur Entwicklung von T parallel verlaufendes Ereignis ist; oder wie in Abb. 52 C, wo die Änderung des Membranpotentials der entscheidende Anstoß ist für die Entwicklung der Toleranz T? Alle drei Möglichkeiten sind experimentell prüfbar.

Bisher haben wir nur begonnen, die erste der genannten Möglichkeiten zu prüfen (Abb. 52 A). Inkubation der Hybridzellen mit Morphin, Ach oder NA erhöht die cGMP-Spiegel nur vorübergehend (allenfalls für einige Minuten). Reicht diese kurzzeitige Erhöhung der intrazellulären Konzentration von cGMP aus, um eine

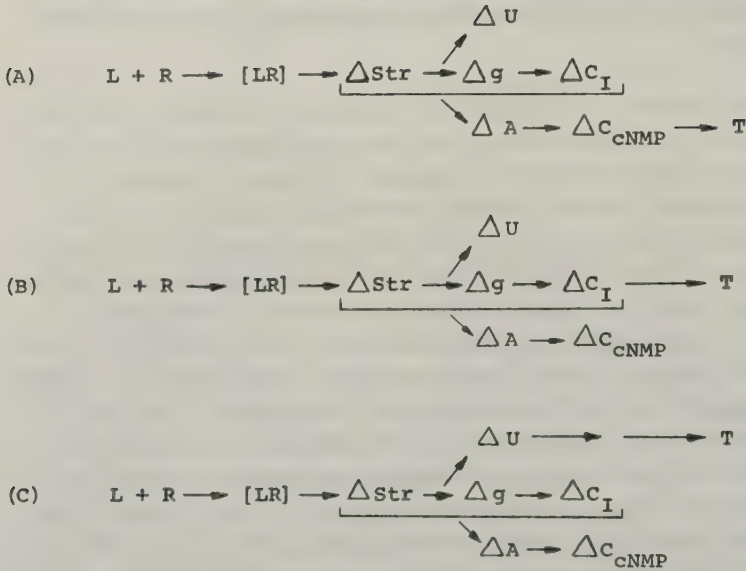


Abb. 52. 3 Hypothesen für die Entwicklung des Toleranzeffektes T bei Langzeiteinwirkung von Opiaten, cholinergen oder adrenergen Agonisten. L, Ligand (Agonist); R, Rezeptor; [LR], Ligand-Rezeptor-Komplex; ΔStr , Strukturänderung von Rezeptor und/oder Membran; Δg , Änderung der Ionenpermeabilität; ΔC_I , Änderung der intrazellulären Ionenkonzentration; ΔU , Änderung des Membranpotentials; ΔA , Änderung der spezifischen Aktivität von Purylatcyclasen; ΔC_{cNMP} , Änderung der intrazellulären Konzentration von cyclischen Nucleotiden; T, Toleranz (249).

Kettenreaktionen auszulösen, an deren Ende schließlich das Auftreten von Toleranz steht?

Zur Prüfung dieser Hypothese wurden Replikaplaten mit Zellen

15 h lang mit Carbamylcholin bzw. Isoproterenol vorinkubiert. Bei einigen Platten wurde 20 min nach Beginn der Vorinkubation Atropin bzw. Phentolamin zugesetzt, um von diesem Zeitpunkt an die Wirkung des Carbamylcholins auf den muscarinischen AcCh-Rezeptor bzw. des Isoproterenols auf den α -adrenergen Rezeptor zu unterbinden. Nach 15 h Vorinkubation wurden die Medien gegen Inkubationsmedium ausgetauscht und die Zellen 10 min mit und ohne PGE_1 inkubiert (Hauptinkubation). Tab. 19 zeigt, daß die 20-minütige Vorinkubation mit Carbamylcholin oder Isoproterenol zu Beginn der 15-h-Periode nicht ausreicht, erhöhte Reaktion der Zellen auf PGE_1 (Toleranz) zu erzeugen. Damit wird es unwahrscheinlich, daß die kurzzeitige Steigerung des cGMP-Spiegels zu Beginn der langen Inkubation der Zellen mit Isoproterenol oder Carbamylcholin (oder Morphin) für die Ausbildung der Toleranz verantwortlich ist.

Langzeiteffekte entwickeln sich nicht, wenn die Zellen 16 h lang mit cGMP (1 und 10 μM) bzw. DBCG (1 und 10 μM) inkubiert werden (215). Solche Ergebnisse würden mehr Aussagekraft besitzen, wenn sie aus Versuchen über einen weiten Konzentrationsbereich nicht abbaubarer Derivate des cGMP stammten.

Die Zahl der Hypothesen über die Wirkungsweise des Morphins läßt sich durch die Klärung einer weiteren Frage eingrenzen. Die Hybridzellen besitzen Cholin-Acetyltransferase-Aktivität (71-73) und damit die Fähigkeit, AcCh zu synthetisieren. Wir haben gesehen, daß das AcCh-Analogon Carbamylcholin ebenso wie Morphin und Isoproterenol die Entwicklung von Langzeiteffekten (Toleranz) ermöglicht. Es ist nun von vornherein nicht auszuschließen, daß Morphin oder Isoproterenol zunächst die Geschwindigkeit der AcCh-Synthese oder -Ausscheidung erhöht. Das von den Zellen ausgeschiedene AcCh würde dann die Langzeiteffekte verursachen. Die Wirkung von Morphin oder Isoproterenol würde damit auf die des AcCh zurückgeführt. Zwei Beobachtungen widerlegen diese Hypothese.

Tab. 19. Ist die vorübergehende Erhöhung des cGMP-Spiegels verantwortlich für die Entwicklung von Toleranzphänomenen? Versuchsbedingungen siehe Text. $2,4 \times 10^6$ lebende Hybridzellen 108CC15, Passage 10, Lebensfähigkeit 97 %.

Vorinkubation (15 h)	Konzentra- tion (μM)	Hauptinkubation (10 min)	
		cAMP (pMol/mg Protein) ohne Zusatz	PGE ₁ (3 μM)
ohne Zusatz	-	34 $\pm$ 3	1320 $\pm$ 50
Carbamylcholin	10	31 $\pm$ 1	3630 $\pm$ 260
Atropin	100	26 $\pm$ 3	1800 $\pm$ 190
Carbamylcholin + Atropin	10, 100	86 $\pm$ 8	2250 $\pm$ 220
Carbamylcholin; nach 20 min Atropin	10, 100	31 $\pm$ 4	1790 $\pm$ 80
ohne Zusatz	-	34 $\pm$ 3	1320 $\pm$ 50
D,L-Isoproterenol	200	36 $\pm$ 1	4430 $\pm$ 310
Phentolamin	100	23 $\pm$ 5	1450 $\pm$ 190
D,L-Isoproterenol + Phentolamin	200, 100	57 $\pm$ 7	1660 $\pm$ 130
D,L-Isoproterenol; nach 20 min Phentolamin	200, 100	25 $\pm$ 3	1290 $\pm$ 80

Erstens erhöht Vorinkubation mit Isoproterenol die Cholin-Acetyltransferase-Aktivität nicht signifikant (216). Zweitens erzeugt Morphin auch in der Neuroblastoma-Linie N4TG3 Toleranzeffekte (Abb. 53). Dieser Zell-Linie fehlen die Enzyme für die Synthese von AcCh oder NA.

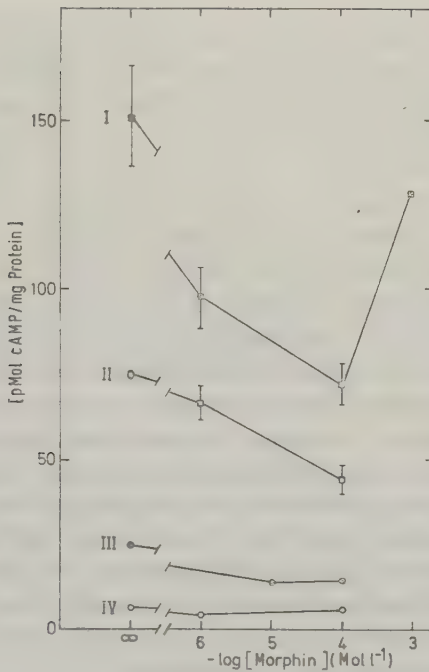


Abb. 53. Toleranzphänomene lassen sich durch Langzeitinkubation mit Morphin auch in Neuroblastomazellen N4TG3 erzeugen. Kurve I, Zellen 60 h mit 10 μ M Morphin vorinkubiert, Wirkung von 3 μ M PGE₁ in Gegenwart steigender Konzentrationen Morphin gemessen nach 10 min Hauptinkubation; Kurve II, wie I, jedoch nicht mit Morphin vorbehandelt; Kurve III, wie I, jedoch ohne PGE₁ während der Hauptinkubation; Kurve IV, wie II, jedoch ohne PGE₁ während der Hauptinkubation. 12,7x10⁶ lebende Zellen pro Platte, Passage 29, Lebensfähigkeit 86 %.

Ein Toleranzphänomen könnte auch teilweise für die starken Schwankungen der Stimulierbarkeit der Hybridzellen durch PGE_1 verantwortlich sein. Wurden die Zellen lange Zeit ohne Mediumwechsel gehalten, so könnte das aus den Zellen immer wieder nachgelieferte und sich extrazellulär akkumulierende AcCh Toleranz erzeugen. In der Tat beobachtet man häufig bei solchen Zellen erhöhte Stimulierbarkeit durch PGE_1 . Andere von den Zellen selbst synthetisierte Substanzen könnten bei den Hybriden dieselben Erscheinungen hervorrufen wie AcCh. Endorphin könnte eine solche Substanz sein. Folgt eine Hauptinkubation mit PGE_1 einem Mediumwechsel der wenige (1-3) h voranging, so kann in dieser Periode ausgeschiedenes AcCh noch keine Toleranz erzeugen. Es kann aber den durch PGE_1 ausgelösten Anstieg des cAMP-Spiegels teilweise verhindern. Einen solchen akuten AcCh-Effekt kann man leicht durch Atropingabe verhindern (Tab. 20). Gleichzeitig ist dieser Versuch der erste Nachweis, daß die Hybridzellen AcCh ausscheiden. Zusatz von Cholin-Acetyltransferase-Inhibitoren, Entzug von Cholin oder Zellzucht in Gegenwart von Atropin sollten diese unerwünschten AcCh-Effekte verhindern.

Tab. 20. Atropinzusatz bei der 10-minütigen Inkubation verhindert die Wirkung von aus Hybridzellen 108CC15 ausgeschiedenem AcCh.

Zusatz (μM)	pMol cAMP/mg Protein
ohne	14 ± 1
Atropin (1)	13 ± 2
PGE_1 (3)	321 ± 13
PGE_1 (3) + Atropin (1)	628 ± 25

Inkubationsbeginn 3 h nach Mediumwechsel (siehe Abb. 15). $8,8 \times 10^5$ lebende Zellen pro Platte, Passage 11, Lebensfähigkeit 94 %.

Es ist weiterhin vorstellbar, daß die Zellen Gelegenheit haben, über lange Zeit PGE_1 auszuscheiden, welches in den Zellen stark erhöhte Phosphodiesterase-Aktivität induziert (siehe Kapitel B.I.4.). Bei nachfolgender Hauptinkubation mit PGE_1 würde wie im vorhergehenden Falle nicht die übliche starke Erhöhung des cAMP-Spiegels erreicht. Zugabe von MIBX während der Inkubation mit exogenem PGE_1 sollte den cAMP-Spiegel stark anheben. Damit würde die Ursache der anfänglichen geringen Stimulierbarkeit evident. Es ist zu vermuten, daß bei rigoroser Standardisierung der Versuchsbedingungen Zellen reproduzierbarer Stimulierbarkeit erhalten werden.

4. Diskussion der Langzeiteffekte.

Das "Opiat-Neuron".

In vivo-Befunde, die sich mit unseren Ergebnissen korrelieren lassen.

Nur die akuten Effekte, die bei niedriger Opiat-Konzentration in unserem Zellsystem beobachtet werden, sollten denjenigen entsprechen, die man im tierischen Körper beobachtet. Die akuten Opiateffekte in vivo gründen sich folglich mindestens auf einen Anstieg der cGMP- und einen Abfall der cAMP-Spiegel. Wir haben ferner gezeigt (50), daß Morphin die Plasmamembran differenzierter Hybridzellen depolarisiert. Bei einem Neuron würde man von Aktivierung, d.h. Erniedrigung des Schwellwertes für die Auslösung eines Aktionspotentials sprechen. Im Gegensatz dazu hebt PGE_1 die cAMP-Spiegel an und hyperpolarisiert die Membranen der Hybridzellen (50). In einer Nervenzelle würde dies Inhibierung neuronaler Aktivität bedeuten.

Da Morphin in einem Tier analgetische Wirkung zeigt, könnte man spekulieren, daß die Neuronen, welche Opiatrezeptoren tragen, hier "Opiat-Neuronen" genannt, inhibitorische Neuronen sind, welche durch Opiate oder ihr physiologisches Äquivalent aktiviert und durch PGE_1 oder andere endogene Agentien mit vergleichbarer Wirkung inhibiert werden. Diese "Opiat-Neuronen" sollten mit den Neuronen, die z.B. Schmerz registrieren, verbunden sein.

Nach längerer Behandlung der Hybridzellen mit Opiaten verursacht PGE_1 einen erhöhten Anstieg der intrazellulären cAMP-Spiegel. Nun würde eine erhöhte Konzentration des Opiats benötigt werden, um den Effekt des PGE_1 zu kompensieren. Dies würde dann der Opiattoleranz in Tieren und Menschen entsprechen. In Bezug auf das "Opiat-Neuron" würde dies bedeuten, daß eine größere Menge an Opiat benötigt wird, um der hyperpolarisierenden Wirkung des PGE_1 (oder seines physiologischen

Äquivalents) entgegenzuwirken. In toleranten Tieren würde demnach das "Opiat-Neuron" die Tendenz haben, weniger häufig zu feuern, d.h. es hätte verminderte inhibitorische Wirkung (Entzugssphänomen), bis es wieder mit einer ausreichenden Menge Opiat versorgt ist.

Wir haben gesehen, daß ein Entzugseffekt auch in Hybridzellen erzeugt werden kann. Wenn morphinvorbehandelte Zellen mit PGE_1 oder PGE_1 + Morphin stimuliert werden, sind die cAMP-Spiegel in Abwesenheit von Morphin viel höher als in seiner Anwesenheit (Abb. 45). Oder anders gesagt: In morphinvorbehandelten Zellen ist das verstärkte Ansprechen auf PGE_1 viel ausgeprägter, wenn Morphin fehlt. Daß erhöhte cAMP-Spiegel im Gehirn korreliert werden können mit Morphin-Entzugsserscheinungen, wurde kürzlich auch in Tierversuchen gezeigt (217). In dieses Bild paßt außerdem der Vorschlag von Clark et al. (218), daß die erhöhten Proteinkinase-Spiegel, die man im Rattengehirn nach Morphin-Entzug findet, etwas mit Entzugsserscheinungen zu tun haben könnten. Dies spricht für die Brauchbarkeit unseres Modellsystems und unserer eben entwickelten Modellvorstellung für das "Opiat-Neuron".

Wie die Langzeiteffekte nach Morphinbehandlung bei Zellkulturen bzw. die entsprechenden Toleranzphänomene bei Tieren zustande kommen, ist bis jetzt noch völlig unklar geblieben. Wir wissen nur, daß Proteinbiosynthese beteiligt sein muß. Die Bedeutung des raschen cGMP-Anstieges bei Kurzzeitinkubation mit Opiaten bleibt ungeklärt. Im Gegensatz zu cAMP konnte man in vivo bisher weder bei akuten (192, 193) noch bei chronischen Opiateffekten (217, 219) eine Beteiligung von cGMP feststellen. Technische Schwierigkeiten (Probennahme) könnten dafür verantwortlich sein, daß bisher keine Änderungen von cGMP-Spiegeln durch Morphin in vivo beobachtet wurden.

Langzeiteffekte werden in unserem Modellsystem nicht nur von

Morphin, sondern auch von adrenergen oder cholinergen Agonisten ausgelöst. Dies scheint auf den ersten Blick der Einmaligkeit der in vivo beobachteten Opiateffekte zu widersprechen, und man könnte folgern, daß die Erhöhung bzw. Senkung der Spiegel der cyclischen Nucleotide eine allen diesen Substanzen gemeinsame Eigenschaft ist. Die in vivo-Effekte des Morphins sowie adrenerger oder cholinerges Agonisten sind bei gleicher Applikationsweise jedoch nicht vergleichbar. Im Gegensatz zu den Opiaten können adrenerge oder cholinerge Agonisten die Blut-Hirn-Schranke nicht durchdringen und somit nicht an einen möglichen Wirkungsort im Gehirn gelangen. So ist z.B. die im Vergleich zu Morphin viel größere Wirksamkeit des Heroins darauf zurückzuführen, daß es wegen seiner größeren Lipidlöslichkeit die Blut-Hirn-Schranke besser durchdringen kann. Im Gegensatz dazu ist Heroin in Zellkultur nicht wesentlich wirksamer als Morphin. Ein Vorteil des Zellkultursystems ist also, daß man die molekularen Wirkungsmechanismen von Opiaten und Neurohormonen auf zellulärer Ebene unter Ausschluß komplizierender Nebenerscheinungen studieren kann.

Die Hybridzellen besitzen Rezeptoren für Morphin, AcCh, NA, PGE_1 und Adenosin. Es ist möglich, aber vielleicht unwahrscheinlich, daß irgendein "Opiat-Neuron" (in vivo) diese Kombination von Rezeptoren besitzt. Das mindert aber keinesfalls den Wert der Untersuchungen an einem Modellsystem wie der Hybridzelle. Denn es ist wahrscheinlich, daß die meisten Neuronen Neurohormon-Signale entgegengesetzter Wirkung empfangen. Welche Neurohormone das im einzelnen sind, ist dabei allenfalls von lokaler, nicht von prinzipieller Bedeutung. Gerade dies lehren die Versuche an den Hybridzellen, bei denen es gleichgültig ist, welche der drei Substanzen AcCh, NA oder Morphin mit welcher der beiden Verbindungen Adenosin oder PGE_1 kombiniert wird.

Nach dem eben Gesagten ist besonders bemerkenswert, daß im

Gehirn die Rezeptorkombination der Hybridzellen zumindest teilweise verwirklicht ist. NA ruft bei intraventrikulärer Applikation morphinähnliche Wirkungen hervor, die nicht durch den Morphin-Antagonisten Naloxon hemmbar sind (220). Dieser Befund konnte allerdings von anderer Seite nicht bestätigt werden (221). Auch bei intraventrikulärer Applikation von AcCh wurde wie durch Morphin Analgesie erzeugt (222). In diesem Fall jedoch war der Effekt durch Naloxon hemmbar. Dies läßt vermuten, daß AcCh hier indirekt wirkt, indem es die Freisetzung von Endorphin auslöst.

VI. Untersuchungen über die Gegenwart weiterer Hormonrezeptoren an Hybridzellen.

Besitzen die Hybridzellen neben den Rezeptoren für PGE_1 , Adenosin, AcCh, NA und Morphin solche für weitere Hormone? Zur Untersuchung dieser Frage wurde festgestellt, ob die Hormon-Kandidaten den cAMP-Spiegel steigerten oder die Erhöhung des cAMP-Spiegels durch PGE_1 hemmten. Aus drei Gründen kann bei negativen Ergebnissen nicht auf Abwesenheit der entsprechenden Rezeptoren geschlossen werden:

- 1) Es kann derzeit noch nicht ausgeschlossen werden, daß Hormone den cGMP-Spiegel verändern, ohne den cAMP-Spiegel gleichzeitig zu beeinflussen.
- 2) Die Hormone könnten in einer Konzentration oder einem Zeitbereich untersucht worden sein, in welchem ihre Wirkung noch nicht oder nicht mehr eintritt oder feststellbar ist.
- 3) Es gibt keine Gründe, die zu der Annahme berechtigen, daß alle Hormone über eine Veränderung der Spiegel cyclischer Nucleotide wirken.

In Tab. 21 ist das Ergebnis von Messungen gezeigt, bei denen Serotonin, Histamin, Glucagon, Bradykinin und Substanz P untersucht wurden. Bradykinin, ein Nonapeptid (223,224), und Substanz P, ein Undecapeptid (224,225), sind pharmakologisch hochwirksame Faktoren, die sich an ihrer muskelkontra-hierende Wirkung zu erkennen geben. Substanz P, die konzentriert im Hypothalamus, Rückenmark und Dünndarmwand vorkommt, ist vermutlich ein Neurotransmitter (225-228). Weder allein noch zusammen mit MIBX oder Morphin verändern Serotonin, Histamin, Glucagon oder Bradykinin den cAMP-Spiegel wesentlich. Interessanterweise hemmt $1 \mu\text{M}$ Substanz P den durch PGE_1 ausgelösten Anstieg des cAMP-Spiegels teilweise. In einem Wiederholungsversuch (Tab. 23) wurde selbst bei 10fach höherer Konzentration kein Effekt beobachtet. Bradykinin und Substanz P könnten durch Peptidasen in der Kultur abgebaut werden.

Tab. 21. Untersuchung der Hybridzellen 108CC15 auf weitere
Rezeptoren (I).

Exp. Nr.	Zusatz	Konzentra- tion (μM)	ohne PGE ₁ cAMP (pMol/mg	mit PGE ₁ (3 μM) Protein [†]
1	Kontrolle	-	22	2130 [±] 140
	Serotonin	100	-	2290
	Histamin	100	-	2470
2	Kontrolle	-	15 [±] 2	1280 [±] 110
	MIBX	500	33 [±] 1	-
	Serotonin	100	15 [±] 1	-
	Serotonin+MIBX	100, 500	28 [±] 1	-
	Histamin	100	14 [±] 2	-
	Histamin+MIBX	100, 500	25 [±] 3	-
	Glucagon	1	16 [±] 2	-
	Glucagon+MIBX	1, 500	41 [±] 3	-
	Bradykinin	0,001	12 [±] 2	-
		0,01	11 [±] 1	1200 [±] 80
		0,1	15 [±] 1	1290 [±] 90
		1	17 [±] 2	1350 [±] 60
		10	15 [±] 2	-
	Bradykinin+MIBX	1, 500	40 [±] 5	-
	Substanz P	0,001	15 [±] 1	-
		0,01	13 [±] 3	1210 [±] 80
		0,1	12 [±] 1	-
		1	14 [±] 1	886 [±] 60
	Substanz P+MIBX	1, 500	29 [±] 5	-

Inkubationszeit 10 min. Experiment 1, Inkubation direkt nach dem Mediumwechsel; $3,5 \times 10^6$ lebende Zellen pro Platte, Passage 12, Lebensfähigkeit 98 %. Experiment 2, Inkubation 3 h nach Mediumwechsel (siehe Abb. 15); $2,8 \times 10^6$ lebende Zellen pro Platte, Passage 14, Lebensfähigkeit 97 %.

Weitere Untersuchungen unter Verwendung von Inhibitoren dieser Peptidasen (z.B. "Angiotensin converting enzyme inhibiting factor") (229) sind deshalb notwendig.

Weder Melatonin noch Taurin, GABA und Amphetamin beeinflussen den cAMP-Spiegel (Tab. 22).

Tab. 22. Untersuchung der Hybridzellen 108CC15 auf weitere Rezeptoren (II).

Zusatz	Konzentration (μM)	ohne PGE ₁	mit PGE ₁ (3 μM) cAMP (pMol/mg Protein)
Kontrolle	-	10 ⁺²	351 ⁺¹²
Melatonin	100	8	366 ⁺²²
Taurin	100	10	370 ⁺²⁸
GABA	100	9	413 ⁺⁵
Amphetamin	100	12 ⁺¹	226 ⁺¹⁸
NA	10	-	30 ⁺³
Amphetamin + NA	100, 10	-	40 ⁺⁶
Phentolamin	100	-	304 ⁺¹⁶
Phentolamin + NA	100, 10	-	238 ⁺¹⁴
Phentolamin + Amphetamin	100, 100	-	263 ⁺¹⁰

Inkubationsbedingungen siehe Tabelle 21, Experiment 2.
1,2x10⁶ lebende Zellen pro Platte, Passage 14, Lebensfähigkeit 98 %.

Das dem NA ähnliche Octopamin wurde zuerst in den Speicheldrüsen des Tintenfisches gefunden (230). In der Meeresschnecke Aplysia übernimmt es vermutlich die Neurotransmitterrolle des NA (231). Es kommt in kleinen Konzentrationen auch im Säugerhirn vor (232). Auf die Hybridzellen wirkt es schwächer als NA, jedoch stärker als Morphin (Tab. 23).

Tab. 23. Untersuchung der Hybridzellen 108CC15 auf weitere Rezeptoren (III).

Zusatz	Konzentration (μM)	ohne PGE_1 cAMP (pMol/mg Protein)	mit PGE_1 ($3\mu\text{M}$)
Kontrolle	-	16	1140 ± 60
NA	1	15	36 ± 1
Octopamin	1	-	570 ± 19
Substanz P	10	-	1120
Morphin	1	-	1030 ± 100
	10	-	651 ± 5
	100	-	541 ± 16

Inkubationsbedingungen siehe Tabelle 21, Experiment 1.
 $2,4 \times 10^6$ lebende Zellen pro Platte, Passage 12, Lebensfähigkeit 95 %.

In Kapitel B.II. wurde bereits die Wirkung von Adenosin, AMP, ADP und ATP bzw. die Unwirksamkeit von Adenin beschrieben. Wie Tab. 24 zeigt, sind Guanin sowie Guanosin unwirksam. Eben- sowenig wirksam sind die im Gehirn vorkommenden Amine (233, 234) Piperidin oder Pyrrolidin (Tab. 24). Trijodthyronin steigert den cAMP-Spiegel in Gegenwart von PGE_1 (Tab. 24). Die physiologische Bedeutung dieses Effekts muß angezweifelt werden.

Schließlich wurde eine Reihe biologisch hochwirksamer Substanzen untersucht. 1) Das Tripeptid "Thyreotropin-releasing hormone" (TRH), das mit Sicherheit auch Wirkungen hervorruft, die mit seinem Namen nichts zu tun haben (235, 236). So wirkt es z.B. bei lokaler Applikation im Gehirn wie Naloxon. 2) Die in der Haut von Amphibien in hoher Konzentration vorkommenden Peptide Physalaemin (224) und Caerulein (224), die strukturell eng mit Substanz P und menschlichem Gastrin II verwandt sind. 3) Die aus Bohnen isolierten Lectine (237)

Tab. 24. Untersuchung der Hybridzellen 108CC15 auf weitere Rezeptoren (IV).

Exp. Nr.	Zusatz	Konzentration (μM)	ohne PGE_1 , cAMP (pMol/mg Protein)	mit PGE_1 ($3\mu\text{M}$)
1	Kontrolle	-	42	1520 ± 160
	MIBX	500	46 ± 6	4330 ± 380
	Piperidin	100	51 ± 2	1330 ± 100
		1000	37 ± 5	1450 ± 30
	Piperidin+MIBX	100, 500	59 ± 4	-
	Pyrrolidin	100	41 ± 5	1440 ± 110
		1000	43 ± 1	1260 ± 100
	Guanin	1000	39 ± 1	1310 ± 30
2	Kontrolle	-	27 ± 3	1350 ± 140
	Guanosin	100	30 ± 3	1340 ± 70
	Trijodthyronin	30	18 ± 1	2200 ± 140
	Morphin	10	-	810 ± 20

Inkubationsbedingungen zu Experiment 1 siehe Tabelle 21, Experiment 1; $3,3 \times 10^6$ lebende Zellen pro Platte, Passage 21, Lebensfähigkeit 97 %. Inkubationsbedingungen zu Experiment 2 siehe Tabelle 21, Experiment 2; $2,7 \times 10^6$ Zellen, Passage 9, Lebensfähigkeit 94 %.

Concanavalin A und Phythämagglutinin. Sie binden Mannoside und Glucoside bzw. N-Acetylgalactosamin und können die Spiegel cyclischer Nucleotide verändern (238,239). Außer den Lectinen, die den cAMP-Spiegel der Hybridzellen erhöhen, ist keine der genannten Substanzen wirksam (Tab. 25).

Tab. 25. Untersuchung der Hybridzellen 108CC15 auf weitere Rezeptoren (V).

Zusatz	Konzentration	ohne PGE ₁ cAMP ¹	mit PGE ₁ (3µM) (pMol/mg Protein)
Kontrolle	-	23 [±] 2	474 [±] 42
TRH	0,1 µM	-	362 [±] 44
	10 µM	21 [±] 3	599 [±] 33
Physalaemin	0,1 µM	39	553 [±] 12
	1	30 [±] 5	440 [±] 14
Caerulein	0,1 µM	28 [±] 3	499 [±] 13
	1	43 [±] 2	407 [±] 11
Concanavalin A	25 µg/ml	63 [±] 1	834 [±] 7
	250 µg/ml	46 [±] 4	806 [±] 44
Phythämagglutinin	50 µg/ml	71 [±] 8	547 [±] 33
	500 µg/ml	125 [±] 20	560 [±] 55

Inkubationsbedingungen siehe Tab. 21, Experiment 1; $0,8 \times 10^6$ lebende Zellen pro Platte, Passage 20, Lebensfähigkeit 95 %.

C. EXPERIMENTELLER TEIL.

I. Apparate, Geräte, Hilfsmittel.

1. Zellkultur.

Sterile Arbeitsplätze, Edgegard und Biogard Hood,
The Baker Co., Inc., Sanford, Maine, USA.

CO₂-Inkubatoren, Forma Scientific Model 329 und 3151
Marietta, Ohio, USA; über Fa. Labotect, Göttingen.

Flüssigstickstoff-Tiefkühltruhe, Modell VPS-3500, mit Einsät-
zen A-4500 und Stickstofftank VL-160 L,
Minnesota Valley Engineering, New Prague, Minnesota, USA.

Zelleinfriergerät, Union Carbide Model BF-4,
Fa. Messer, Griesheim.

Sterilfiltrationsgerät zum Sterilisieren von Medium, Millipore-
Filter GmbH, Neu-Isenburg.

Schlauchpumpe Masterflex, variable Geschwindigkeit,
Cole-Parmer Instr., Co., Chicago, Illinois, USA.

Touch-O-matic Bunsenbrenner, Hanau Engineering,
Buffalo, New York, USA; über LS Laborservice, München.

Pipettierhilfen, Piggyback pipetter PB 2 und PB 10,
Scientific Industries Inc., Bohemia, New York, USA.

Plastikwaren (Petrischalen, Kulturflaschen usw.),
Falcon Plastics, über LS Laborservice, München;
Greiner Plastik, über Fa. Boll, München.

Sterilfilter aus Plastik zum Einmalgebrauch, Nalgene Filter
Units No. 120, Metro Scientific, Farmingdale, New York, USA.

Medienflaschen (1000, 500 und 100 ml), Sovirel,
Fa. Bachofer, Reutlingen; Deckel eingeklebt mit Silikon-
kautschuk SV43 (Wacker) bezogen von Gummi-Menzel, München.

Invertmikroskope (Phasenkontrast), Carl Zeiss AG., Oberkochen
und Ernst Leitz AG., Wetzlar.

Mikroskop, Carl Zeiss AG., Oberkochen

Hämocytometer, Arthur Thomas Co., Philadelphia, Pennsylvania,
USA.

Ultraschall-Zellaufschlußgerät, Branson Sonifier,
Modell S75 mit Mikrospitze, Branson Instruments Inc.,
Danbury, Connecticut, USA.

2. cAMP-Bestimmung.

Filtrationsgeräte, Millipore-Filter GmbH, Neu-Isenburg,
Modell XX1002530 ($\varnothing$ 25mm) oder Sartorius GmbH., Göttingen,
Modell SM16315 ($\varnothing$ 25mm).

Vakuumpumpe, Drehschieberölpumpe PUZ176F, Dürr-Dental,
Bietigheim.

Filter, Cellulosenitrat, 0,45 μ m Porenweite, 25 mm $\varnothing$,
Sartorius GmbH., Göttingen.

Plastiktrichter für Miniatursäulen aus Pasteurpipetten,
verwendet von Einmal-Plastiksäulen (Chromaflex column),
Kontes Glass Co., Vineland, New Jersey, USA.

3. Prostaglandinbestimmung.

Glassäulen, serological glass disposable pipets, 10 ml, Corning Cat. No. 7079/10, Arthur Thomas Co., Philadelphia, Pennsylvania, USA.

Plastikreagenzröhrchen (Polypropylen), 17x100 und 12x75 mm, Greiner Plastik, über Fa. Boll, München.

Dünnschichtplatten-Streichgerät und Dünnschicht-"Scraper", Desaga GmbH., Heidelberg.

4. Sonstiges.

Flüssigkeitsszintillationsspektrometer, Packard Tri-Carb, Modelle 3380 (plus AAA Computer Modell 544) und 3385.

Dünnschichtscanner, Friesseke-Hoepfner LB 272 mit Dual Ratemeter-Integrator LB242K.

Lyophilisator, Modell LO5, mit Plastikhaube und heizbaren Stellplatten, WKF, Brandau.

Laborzentrifuge, kühlbar, Roto-Silenta K, Fa. Hettich, Tuttlingen.

Automatic Superspeed Centrifuge, Sorvall RC2B, Rotoren GS3, GSA, SS34; Stahlbecher; Hormuth und Vetter, Wiesloch.

Dampfsterilisatoren, Fedegari, Pavia, Italien und Euro-Clinic, Martinsried.

pH-Meter, Modell E532, Deutsche Metrohm, Bernhausen.

Osmometer, Halbmikro, Fa. Knauer u. Co. GmbH., Berlin.

Spektralphotometer Zeiss, Modell M4QII.

Whirlmix, Cenco, Niederlande und Vortex, Scientific Industries, Springfield, Mass., U.S.A. über Fa. Bachofer.

Homogenisator Sorvall Omnimix, Hormuth und Vetter.

Säulen mit Zubehör, Serva-Technik, Heidelberg.

Fraktionskollektor Ultro-Rac, LKB, Gräfelfing.

UV-Durchflußmonitor, LKB Uvicord II mit 2-Kanalschreiber.

Schlauchpumpe, LKB Varioperpex.

Mikroliterspritzen, 10, 25, 50 μ l, Hamilton, Fa. Schmid, Hamburg und Terumo, Fa. Bachofer, Reutlingen.

Mikroliterpipetten, fest, Eppendorf, und verstellbar, Finn-Pipetten, Fa. Friedrich und Hofmann, Puchheim.

Tischrechner, Sony Sobax 2550 und Canon Canola L121.

II. Chemikalien.

Nicht eigens aufgeführte Chemikalien stammen von der Firma E. Merck und besaßen die höchste erhältliche Reinheit. Einige nur einmal gebrauchte spezielle Reagentien sind im Text erwähnt.

1. Zellkultur.

Pulvermedium DMEM, fötales Kälberserum, GIBCO, über Fa. Roth, Karlsruhe.

Trypsin, für analytische Zwecke, kristallisiert, lyophilisiert, Boehringer, Mannheim.

Nigrosin, Eastman Organic Chemicals.

Dimethylsulfoxid, p.A., Merck, Darmstadt.

Hypoxanthin, Aminopterin, Bromodesoxyuridin und 6-Thioguanin, Sigma.

Thymidin, p.A., Serva.

2. cAMP-Bestimmung.

Ionenaustauscherharz, Bio-Rad AG 1-XB, 100-200 mesh, Cl^- -Form und AG1-X2, 200-400 mesh, Cl^- -Form, Bio-Rad, München.

cAMP, kristallisiert, Boehringer, Mannheim.

^3H -cAMP, spezifische Radioaktivität zwischen 27 und 37 Ci/mMol, Amersham-Buchler, Braunschweig.

Methylcellosolve, Äthylenglykolmonomethyläther, p.A., Merck.

Serumalbumin vom Rind, kristallisiert, Behring.

3. Prostaglandinbestimmung.

Prostaglandine, Geschenk von Dr. John E. Pike,
The Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan, USA.

DHGLS und Arachidonsäure, The Hormel Institute, Austin,
Minnesota, USA.

$5,6\text{-}^3\text{H-PGE}_1$ (86 Ci/mMol), $5,6\text{-}^3\text{H-PGA}_1$ (87,3 Ci/mMol),
 $5,6\text{-}^3\text{H-PGF}_{1\alpha}$ (73 Ci/mMol), $1\text{-}^{14}\text{C-DHGLS}$ (58,8 mCi/mMol),
 $5,6,8,9,11,12,14,15\text{-}^3\text{H-Arachidonsäure}$ (11,4 Ci/mMol) von NEN.
 $1\text{-}^{14}\text{C-Arachidonsäure}$ (58 mCi/mMol) von Amersham.

Holzkohle (activated, untreated powder) und Kieselsäure für
Säulenchromatographie, SIL-R, 100-300 mesh, Sigma.

Dextran T 70, Pharmacia.

Gelatine (purified, pigskin), Eastman Organic Chemicals.

Dünnschicht-Fertigplatten Kieselgel G ohne Fluoreszenzindikator
20x20 und 5x20 cm, Schichtdicke 0,25 mm, Merck.

Kieselsäure G für Dünnschichtplatten, Merck.

4. Sonstiges.

L-NA-Hydrochlorid, DL-Propranolol-Hydrochlorid, DL-Octopamin-
Hydrochlorid, Atropinsulfat, Taurin, Cycloheximid, Physalaemin,
Caerulein, Bradykinin-Triacetat von Sigma.

DL-Isoproterenol-Hydrochlorid, Dopamin-Hydrochlorid, Histamin-
Hydrochlorid, 5-Hydroxytryptamin-Kreatininsulfat (Serotonin-),

Veratridin von Serva.

Phenylephrin-Hydrochlorid, Protoveratrin A und B,
Szintillatorgemische Rotiszint und Szintigel, Triton X 100
von Roth.

AcCh-Chlorid, Adenosin, Piperidin, Pyrrolidin, Tetraäthyl-
ammoniumchlorid von Merck.

Carbamylcholinchlorid, Melatonin von Fluka.

cGMP, Adenin, AMP, ADP, ATP, Concanavalin A von Boehringer,
Mannheim.

Sephadex G 25 von Pharmacia .

DEAE-Cellulose DE52 von Whatman .

Unisolve 1 (Szintillatorgemisch) von Koch-Light über Fa.
Zinsser, Frankfurt.

Substanz P (bovine, synthetic) von Beckman.

α -Bungarotoxin von Miami Serpentarium
Laboratories, Florida, USA.

D-Tubocurarin, Eserin, TRH, GABA, Phythämagglutinin
(ex kidney bean, B grade), Tetrodotoxin, Valinomycin von
Calbiochem.

Morphin-Hydrochlorid von Boehringer, Ingelheim.

Geschenke.

Phentolamin-Hydrochlorid von Ciba Geigy, Basel.

Levorphanol (Dromoran) 1-Tartrat-dihydrat und

Dextrophan d-Tartrat-monohydrat von Prof. A. Herz, München,
und Hoffmann - La Roche, Grenzach.

L-Methadon-Hydrochlorid (Polamidon), Meperidin-Hydrochlorid
(Dolantin) von Farbwerke Hoechst AG., Frankfurt.

Naloxon-Hydrochlorid von Prof. A. Herz und Endo Laboratories
Inc., Garden City, New York, USA.

Heroin-Hydrochlorid von Dr. G. Megges, Bayerisches Landes-
Kriminalamt, München.

MIBX von G.D. Searle Co., Chicago, Illinois, USA.

SC 19220 von Dr. J. Sanner, G.D. Searle Co.

7-OPS von Prof. J. Fried, University of Chicago.

Amphetamin-Hydrochlorid (Merck) von Prof. N. Matussek, München.

Glucagon (vom Schwein, kristallin), Dr. J.L. Bobbit,

Eli Lilly Co., Indianapolis, Indiana, USA.

Haloperidol von Janssen Pharmazeutika, Belgien.

Bay A 1040 von Dr. K. Schloßmann, Bayer AG., Elberfeld.

Antiserum gegen nicotinische AcCh-Rezeptoren von E. Heilbronn,
National Defence Research Institute, Sundbyberg, Schweden.

III. Zellkultur.

1. Verwendete Zell-Linien.

1) C6-BU-1

C6-BU-1 ist die Bezeichnung für die bromodesoxyuridin-resistente Mutante (67) des Klonen 6 einer Glioma-Zell-Linie. Die Zellen C6 wurden von P. Benda et al., aus einem mit N-Nitroso-methylharnstoff induzierten Hirntumor einer Ratte isoliert (60). Das Kulturmedium besteht aus DMEM/10 % FCS/100 μ M BUdR.

2) N4TG3

Dies ist eine 6-thioguaninresistente Mutante (67) des Klonen N4 aus dem Neuroblastoma C1300 der Maus (20). Das Kulturmedium besteht aus DMEM/10 % FCS/100 μ M 6-TG.

3) 54SCC11

Dies ist die Laborbezeichnung für eine Hybridzell-Linie (65,73), die durch Fusion der Mäuse-Fibroblastenlinie A9 (240-242) und der Ratten-Gliomalinie C6-BU-1 (67) in Gegenwart von inaktiviertem Sendai-Virus erhalten wurde (9x6=54). SCC11 bedeutet "single cell clone" Nr. 11.

Das Kulturmedium besteht aus DMEM/10 % FCS/Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin. Es handelt sich um Selektionsmedium (sogenanntes HAT-Medium), mit dem gegen die mutierten Elternzellen und für die Hybridzellen selektioniert wird (242).

4) Dies ist die Laborbezeichnung für einen bestimmten Klon von Hybridzellen (CC15 = "colony clone" 15), welche durch Fusionierung von Mäuse-Neuroblastomazellen N18TG2 (243) und Ratten-Gliomazellen C6-BU-1 (67) (18x6=108) erhalten worden sind (71-73). Das Fusionsexperiment wurde in Gegenwart von

inaktiviertem Sendai-Virus durchgeführt (68-70). Das Kulturmedium besteht aus DMEM/10 % FCS/HAT.

5) 108CC25

Diese Hybridzell-Linie wurde aus Hybridzellen 108CC5 in Anwesenheit von inaktiviertem Sendai-Virus erhalten (175). Das Kulturmedium besteht aus DMEM/10 % FCS/HAT.

2. Methoden.

2.1. Verwendete Lösungen.

1) Medium DMEM

Inhalt eines Glases oder Beutels Pulvermedium in 10 l bi-distillierten Wassers lösen. Glucosekonzentration falls nötig auf 25 mM bringen. Pro 10 l Medium 37 g NaHCO_3 zugeben. Mit CO_2 begasen bis Medium CO_2 -gesättigt ist. Lösung steril filtrieren und zu je 900 ml auf 1l-Flaschen abfüllen. Die Osmolalität des Mediums beträgt 320-330 m Osm.

2) DMEM/10 % FCS

DMEM 900 ml

FCS 100 ml.

3) BUdR 10 mM

307,4 mg in 100 ml H_2O lösen und steril filtrieren.

4) 6-TG 8 mM

133,7 mg in 100 ml H_2O lösen. Dazu ist Zusatz von einigen Tropfen 1 N NaOH und Erwärmen auf ca. 50°C notwendig. Steril filtrieren.

5) Hypoxanthin 10 mM

1,36 g in 1 l H_2O lösen. Dazu leicht erwärmen und einige Tropfen 1 N NaOH zugeben.

6) Aminopterin 5 mM

0,44 g in 200 ml H_2O lösen. Ebenfalls leicht erwärmen und

und einige Tropfen 1 N NaOH zugeben.

- 7) Thymidin 16 mM. 0,39 g in 100 ml H₂O lösen.
- 8) HAT-Vormischung
1000 ml Hypoxanthin-, 200 ml Aminopterin- und 100 ml Thymidin-Lösung mischen,
steril filtrieren und in Portionen zu je 40 ml abfüllen.
- 9) DMEM/10 % FCS/BUdR 100 µM
DMEM 890 ml
FCS 100 ml
BUdR 10mM 10 ml
- 10) DMEM/10 % FCS/6-TG 100 µM
DMEM 887,5 ml
FCS 100 ml
6-TG 8 mM 12,5 ml
- 11) DMEM/10 % FCS/HAT
DMEM 887 ml
FCS 100 ml
HAT-Vormischung 13 ml
- 12) Puck's Medium D 1 (20x)
80 g NaCl
4 g KCl
0,3 g KH₂PO₄
0,45 g Na₂HPO₄·x7H₂O bzw. 0,3g Na₂HPO₄·x2H₂O
bis zur 500 ml Marke mit H₂O auffüllen, lösen, abfüllen
in Portionen zu 25 ml und dann im Autoklaven sterilisieren.
- 13) Puck's Medium D 1 (1x) (unsteril)
25 ml D 1 (20x) ad 500 ml mit H₂O auffüllen.
- 14) Medium D 1 (1x) mit konzentrierter Lösung von Phenolrot (100x)

25 ml D 1 (20x)
362 mg Phenolrot
Bis zur 500 ml-Marke mit H₂O auffüllen und steril filtrieren.
- 15) Glucose/Sucrose-Lösung
20 g Dextrose · H₂O (18,2 Dextrose anhydr.)
400 g Sucrose

Bis zur 1000 ml-Marke mit H_2O auffüllen und steril filtrieren.

- 16) Trypsin-Vorratslösung 0,5 %ig

0,5 g Trypsin in 99,5 ml D 1 (1x) lösen und steril filtrieren. Abfüllen in Portionen zu ca. 5,2 ml.

- 17) Trypsin 0,005 %ig

Trypsin-Vorratslösung 0,5 %ig 5 ml

Medium D 1 (20x) 25 ml

Glucose/Sucrose-Lösung 25 ml

H_2O bidest. (steril) 444 ml

D 1 (1x)/Phenolrot (100x) 1 ml

Abfüllen in 100 ml Flaschen zu je 60-70 ml und einfrieren.

- 18) D 1 (1x)/Glucose/Sucrose/Phenolrot

Medium D 1 (20x) 25 ml

D 1 (1x)/Phenolrot (konz.) 1 ml

Glucose/Sucrose 25 ml

H_2O bidest. (steril) 449 ml

- 19) Nigrosin 0,5 %ig

0,5 g Nigrosin lösen in 99,5 ml Lsg. (18)

- 20) 1 % $CaCl_2 \cdot 2H_2O$

100 mg $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ in 9,9 ml H_2O lösen.

- 21) 40%ige Glucose

4 g Glucose in 6 ml H_2O lösen.

- 22) Puck's Medium D 2 (1x) (unsteril)

D 1 (20x) 50 ml

1 % $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1,6 ml

40 % Glucose 2,5 ml

Bis zur 1000 ml Marke mit H_2O auffüllen.

- 23) DMEM/7,5 % DMSO

DMEM 92,5 ml

DMSO 7,5 ml

steril filtrieren.

- 24) 1 N NaOH

4,0 g NaOH mit H_2O bis zur 100 ml-Marke auffüllen und in Dampf-Autoklaven sterilisieren.

2.2. Subkultivierung von Zellen.

- 1) Trypsinlösung oder Puck's D 1/Glucose/Sucrose auftauen, mit 1 Tropfen 1 N NaOH versetzen (Farbumschlag nach rot) und in Eis aufbewahren.
- 2) Medium absaugen (von T 75 Kolben oder Platte mit 85mmØ) und Zellen mit 3-5 ml kaltem Trypsin oder D 1/Glucose/Sucrose waschen.
- 3) Waschflüssigkeit absaugen und 3-5ml kaltes Trypsin oder D 1/Glucose/Sucrose zugeben.
- 4) Ca. 5 min bei 37°C im CO₂-Inkubator inkubieren (90 % Luft, 10 % CO₂, ca. 100 % Luftfeuchtigkeit).
- 5) Zellen durch mechanischen Schock ablösen.
10 ml DMEM/10 % FCS (kalt) zusetzen und Zellsuspension tritrieren (auf- und abpipettieren) und dadurch monodisperse Zellsuspension herstellen.
- 6) Zellen und Pipette in sterile Einwegplastikzentrifugenbecher überführen und 5 min mit 500 g bei 0°C zentrifugieren (Hettich Roto Silenta K).
- 7) Überstehendes Medium absaugen und Zellen in geeignetem Volumen DMEM/10 % FCS (kalt) resuspendieren (tritrieren). In Eis aufbewahren.
- 8) Zellzählung durchführen. Dazu 0,5 ml kalter Zellsuspension steril entnehmen und in kleines Zentrifugenglas überführen, das nicht steril zu sein braucht. 0,5 ml 0,5 %iges Nigrosin zugeben, gut mischen und in Eis stellen.
- 9) Zellen im Hämocytometer zählen. Dazu von nigrosinhaltiger Zellsuspension mit Pasteurpipette ein Tröpfchen unter das Deckgläschen des Hämocytometers kapillar saugen lassen.
- 10) Zellen unter dem Mikroskop mit geeigneter Vergrößerung (ca. 75 fach) zählen (getrennt nach toten - mit Nigrosin angefärbten - und lebenden - nicht gefärbten - Zellen).
- 11) Zellen pro ml berechnen und prozentualen Anteil an lebenden Zellen berechnen.

Formel: $\frac{\text{Zahl lebender Zellen pro } n \text{ Zählkammern} \times 10^4 \times 2}{n}$

Lebensfähigkeit: $\frac{\text{Lebende Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 100$

- 12) Zellsuspension auf geeignetes Volumen mit DMEM/10 % FCS verdünnen und auf Kolben oder Platten verteilen, die bereits Medium enthalten (mit den entsprechenden Zusätzen).
- 13) Kolben und Platten in den Inkubator stellen. Diesen mit CO₂ spülen (90 % Luft, 10 % CO₂, ca. 100 % Luftfeuchtigkeit).

2.3. Vorbereiten der Zellen zum Einfrieren.

Behandlung der Zellen nach der Vorschrift "Subkultivierung von Zellen" bis Punkt (6) einschließlich.

Dann:

- 7) Überstehendes Medium absaugen und Zellen in 5 ml DMEM/7,5 % DMSO resuspendieren (triturieren).
- 8) Zellsuspension in sterile verschraubbare Glas- oder Plastikröhrchen geben.
- 9) Röhrchen mit Zellen und ein entsprechendes Röhrchen, das nur 5 ml DMEM/7,5 % DMSO enthält und im Deckel eine Bohrung zur Einführung des Temperaturfühlers besitzt, ins Einfriergerät geben und mit einer konstanten Einfriereschwindigkeit von 1°C pro min einfrieren.

2.4. Zellernte für Prostaglandinbestimmung.

- 1) Medium entfernen und in der Kälte zur Analyse aufbewahren.
- 2) Zweimal waschen mit je ca. 5 ml kaltem DMEM (ohne FCS) oder kaltem Medium D 1.

- 3) Ende eines passend zugeschnittenen Plastiklineals mit Teflonband umwickeln und mit Tesafilm befestigen.
- 4) Zellen mit diesem Werkzeug von der Unterlage abschaben.
- 5) Zellmasse mit Pasteurpipette in kleinen Portionen in Plastikröhrchen 12 x 75 mm einbringen.
- 6) Nochmal mit einigen Tropfen D 1 nachspülen und restliche Zellen sammeln.

Die Gesamtmenge von Zellen in D 1 soll in diesem Falle das Volumen von 2-3 ml nicht überschreiten.

Sollen Enzymspiegel gemessen werden, muß das Volumen unter Umständen so klein als irgend möglich gehalten werden, um hohe Konzentrationen zu erhalten.

- 7) Zellen werden 3x10 sec unter Eiskühlung mit Ultraschall aufgeschlossen (Branson Sonifier, Mikrospitze, Stellung 1). Zellsuspension ist nun bereit zur Extraktion.
- 8) Zellzählung mit einer dafür bestimmten zusätzlichen Platte wie unter 2.2. beschrieben.

IV. cAMP-Bestimmung.

1. Isolierung von cAMP-Bindungsprotein.

Verwendet wurde die Vorschrift von Miyamoto (244), die von mir modifiziert wurde. Muskelfleisch (Rinderschulter) aus frischer Schlachtung (Schlachthof München) wurde in Eis ins Labor gebracht und dort über Nacht bei -30°C aufbewahrt.

Alle folgenden Schritte wurden bei $+4^{\circ}\text{C}$ ausgeführt. 250 g Fleisch wurden noch in gefrorenem Zustand mit dem Messer in kleine Scheiben geschnitten und in 750 ml 4 mM EDTA-Lösung pH 7,0 ca. 3x2 min homogenisiert (Sorvall Omnimix). Das Homogenat wurde 30 min lang bei 27 000 g in einer Sorvall Kühl-

zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde durch tropfenweise Zugabe von 1 N Essigsäure unter Rühren auf pH 4,8 gebracht. Es entstand durch ausflockendes Protein eine Trübung (wenig Niederschlag). Nach 10 min wurde 30 min bei 27000 g zentrifugiert. Der pH-Wert des klaren Überstandes wurde wieder auf 6,5 mit 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,2 (2mM EDTA enthaltend) eingestellt. Das Volumen der Lösung betrug jetzt 869 ml. Dann wurden 32,5 g/100 ml Ammoniumsulfat eingerührt. Nach 30 min Rühren wurde 20 min bei 16000g zentrifugiert.

Der Niederschlag wurde in 48 ml (6% des Rohextraktvolumens) 5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 aufgenommen. Die Lösung wurde über Sephadex G 25 (Säule 2x70cm) entsalzt (Flußgeschwindigkeit 100 ml/h). Die entsalzte Proteinlösung wurde auf eine DEAE-Cellulose-Säule (Whatman DE 52, 2,5x30 cm), die vorher 15 h sorgfältig mit 5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 äquilibriert worden war, gebracht.

Danach wurde die Säule zunächst 3 h mit 5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 (350 ml) und dann 5 h mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 gewaschen (ca. 600 ml). Darauf wurde mit 0,3 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 eluiert. Das Eluat wurde mittels eines Fraktionskollektors in Fraktionen zu je 18-19 ml aufgefangen. Durch Messung der Extinktion bei 280 nm mit einem Durchfluß-UV-Spektrometer konnte Protein in den Fraktionen 31-40 entdeckt werden (siehe Abb. 54). Die 10 Fraktionen wurden gesammelt und auf eine Sephadex G 25 Säule (5x36 cm) gebracht, die vorher mit 5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 äquilibriert worden war.

Eluiert wurde mit 5 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 (Elutionsgeschwindigkeit 100 ml/h). Fraktionen 16 bis 29 (ca. 240 ml) enthielten Protein. Proben 16, 21, 25 und 29 wurden auf cAMP-Bindungskapazität geprüft. Das Ergebnis ist in Abb. 55 gezeigt. Fraktionen 16-27 wurden gemischt, in Portionen zu je 5 ml in Glaszentrifugengläser abgefüllt und bei -150°C in der Flüssigstickstoff-Kühlanlage aufbewahrt.

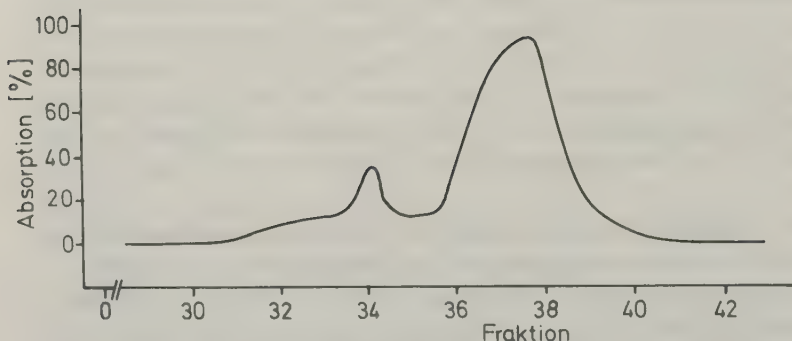


Abb. 54 Elution des cAMP-Bindungsproteins von der DEAE-Cellulose-Säule. Nähere Einzelheiten im Text.

Die Bindungsaktivität ändert sich unter diesen Bedingungen auch nach langer Lagerzeit nicht (ca. 1 Jahr). Vier- bis fünfmaliges Auftauen und Wiedereinfrieren beeinflusst die Aktivität nicht wesentlich. Die Proteinkonzentration beträgt $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Bis jetzt wurden noch zwei weitere Präparationen hergestellt; jedesmal mit sehr gutem Erfolg. Hierbei haben wir festgestellt, daß die Anreicherung vor dem Auftragen auf die DEAE-Cellulose-Säule unterbrochen werden kann. Stehenlassen der entsalzten Proteinlösung über Nacht (ca. 12 h) in Eis brachte kein schlechteres Ergebnis als wenn ohne Unterbrechung angereichert wurde. Es ist wichtig, daß nur vollständig äquilibrierte (pH-Wert, Leitfähigkeit) DEAE-Cellulose-Säulen eingesetzt werden.

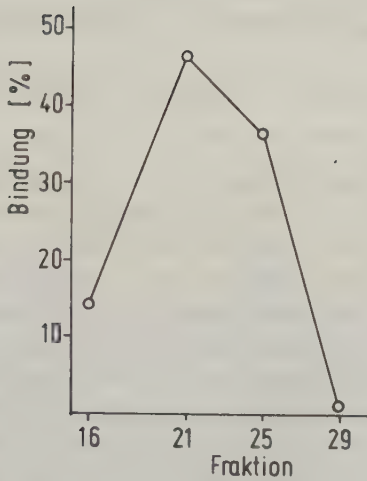


Abb. 55. cAMP-Bindungskapazität in verschiedenen Fraktionen. Es wurden jeweils 50 μ l der Fraktionen 16, 21, 25, 29 und 20000 cpm ^3H -cAMP zur Bestimmung der Bindungskapazität eingesetzt. Meßmethode wie in C.IV.3., Tabelle 27, angegeben (Nullstandard).

2. Inkubation von Zellen mit Hormonen.

Extraktion und Reinigung der cyclischen Nucleotide.

2.1. Kurzzeitinkubation und Extraktion der cyclischen Nucleotide.

Für die Inkubationen verwenden wir "Inkubationsmedium" (Gründe siehe Kapitel B.IV). Es wird hergestellt durch Mischen (im Verhältnis 2/3 : 1/3) von DMEM mit normalem NaHCO_3 -Gehalt und DMEM, das NaCl statt NaHCO_3 enthält. Die Osmolalität soll zwischen 320 und 330 mOsm liegen. Es ist günstig, größere Mengen Medium, bei dem NaHCO_3 durch NaCl ersetzt ist, herzustellen und dieses, in kleinen Portionen abgefüllt, eingefroren aufzubewahren. Es ist nach dem Auftauen vollkommen klar löslich. Vor jedem Versuch wird dieses Medium mit normalem NaHCO_3 -haltigem Medium neu gemischt. Das fertige Inkubationsmedium sollte nicht mehr eingefroren werden, da sich nicht alle Bestandteile beim Wiederauftauen erneut in Lösung bringen lassen. Außerdem ist das Inkubationsmedium im allgemeinen unsteril. Aus diesen beiden Gründen sollte immer nur so viel hergestellt werden, wie tatsächlich gebraucht wird. Übriggebliebenes Inkubationsmedium sollte verworfen werden. Das Inkubationsmedium wird unter ständigem Rühren (Magnetrührer) auf einer Heizplatte bei 37°C gehalten. Außerdem wird es begast mit einer Mischung aus 10 % CO_2 in Luft (Gasfritte), um pH 7,4 einzuhalten.

Für alle Versuche werden die entsprechenden Zellen auf Replikaplastikpetrischalen mit 85mm Durchmesser gezüchtet. Nach Absaugen des Nährmediums und Waschen des Zellrasens mit 5 ml Inkubationsmedium wird so viel von letzterem hinzupipettiert, daß nach Zugabe der Hormonlösungen das Gesamtvolumen 5 ml beträgt. Dann wird sofort (Normalfall) oder nach Ablauf einiger Zeit mit dem Zupipettieren der jeweiligen Drogen begonnen. Immer wenn der Inkubationsbeginn, abweichend vom Normalfall,

Stunden nach dem Mediumwechsel lag, ist dies beim jeweiligen Versuch angegeben. Die unsterilen Hormonlösungen werden mit Hilfe von Eppendorf- und Finnpiptetten ins Inkubationsmedium pipettiert. Prostaglandine und 7-OPS sind in 95%igem reinem Äthanol gelöst, SC19220 und MIBX in Inkubationsmedium, alle anderen Hormone und Drogen in Wasser. Während einer Inkubation ist so maximal 0,3 bis 1 % 95 %iges Äthanol zugegen. Zugabe reiner Lösungsmittel (Äthanol oder Wasser) hat keinen Einfluß auf die cAMP-Spiegel nicht mit PGE_1 inkubierter Zellen. Äthanol vergrößert den durch PGE_1 hervorgerufenen Anstieg des cAMP-Spiegels. Die Zellen werden während der Standardinkubation (10 min) im CO_2 -Inkubator bei 37°C und 15 % CO_2 inkubiert. In der Regel wird jede Inkubation dreifach an Replika-Platten ausgeführt, um später einen über drei Parallelplatten gemittelten cAMP-Wert mit entsprechenden Standardabweichungen zu erhalten. Bei manchen nicht versuchsentscheidenden Kontrollversuchen reicht eine Einfachbestimmung. Abweichungen von dieser Norm werden an entsprechender Stelle erwähnt.

Nach der Inkubation (pH-Wert steigt von 7,4 auf pH 7,7) wird das Inkubationsmedium, falls man auf die Messung des cAMP-Gehalts im Medium verzichtet, abgesaugt und verworfen. Andernfalls wird es in ein Glaszentrifugenglas überführt und bis zur weiteren Verarbeitung entweder im Eis aufbewahrt oder eingefroren. Dann gibt man rasch ca. 2 ml eiskalte 8 %ige Trichloressigsäure auf den Zellrasen und verteilt sie gleichmäßig. Nun werden zur späteren Ausbeutebestimmung in jede Platte 4-5000 cpm ^3H -cAMP, gelöst in Wasser, zupipettiert. Die überstehende Trichloressigsäure enthält das gesamte intrazelluläre cAMP. Abkratzen der Zellen von den Plastikschaalen und Homogenisation ist unnötig. Die cAMP-haltige Trichloressigsäure wird mit einer Pasteurpipette in ein Glaszentrifugenglas mit Schliff überführt. Dann wird viermal mit je 2 ml wasser-gesättigtem Äther extrahiert und zwar - im Gegensatz zu einer anderen Vorschrift (123) - ohne vorher mit 1 N HCl anzusäuern.

Ansäuern auf dieser Stufe der Aufarbeitung würde bei dem nachfolgenden Säulenschritt, bei dem mit 0,1N HCL eluiert wird, eine beträchtliche Selbstelution schon beim Waschen der Säule mit sich bringen. Mehrere Versuche mit ^{14}C -markierter Trichloressigsäure haben eindeutig nachgewiesen, daß auch ohne Ansäuern die Trichloressigsäure quantitativ entfernt werden kann. Das Ausschütteln der Proben erfolgt zweckmäßigerweise, indem man nach Zugabe des Äthers Glasstopfen aufsetzt und die Proben in ein Reagenzglasgestell gibt. Werden die Glasstopfen auf geeignete Weise festgehalten, z.B. mit einem Brett, können so 50 bis 60 Proben zugleich ausgeschüttelt werden. Der trichloressigsäurehaltige Äther wird verworfen. Das cAMP (und entsprechend auch cGMP) befindet sich in der wässrigen Phase. Am Ende der Ausschüttelprozedur liegt der pH-Wert der cAMP- und cGMP-haltigen Phase bei 2,8. Restlicher Äther wird mit Luft abgeblasen. Die Aufarbeitung kann an jeder beliebigen Stelle unterbrochen werden.

2.2. Langzeitinkubation.

Für die Langzeitinkubation (Vorinkubation) wird eine sterile wäßrige Lösung des Hormons oder der Droge (Ausnahme: PGE_1) ins Wachstumsmedium pipettiert (z.B. 0,2 ml zu 20 ml Wachstumsmedium), so daß das Lösungsmittelvolumen nicht größer als 1 - 2 % des Gesamtvolumens ist. Entsprechende Kontrollen ohne Hormon zeigen, daß das Lösungsmittel keinen Einfluß auf die beobachteten Effekte hat. Da PGE_1 in Wasser nur sehr schwer löslich ist, bereiten wir eine 100 μM Lösung zweckmäßigerweise, indem wir die 1 mM alkoholische Vorratslösung mit Inkubationsmedium (steril!) verdünnen.

Am Schluß der Vorinkubationszeit wird das drogenhaltige Medium abgesaugt und verworfen. Dann werden die Zellen falls nicht anders beschrieben 1 x mit Inkubationsmedium gewaschen.

Nach Zupipettieren von 5 ml des letzteren (bzw. so viel, daß nach Zugabe der Hormonlösungen ein Gesamtvolumen von 5 ml erreicht wird) wird sofort, falls nicht anders beschrieben, mit der Hauptinkubation begonnen. Die weitere Prozedur entspricht dem unter 2.1. Gesagten.

2.3. Anionenaustauscherchromatographie.

a) Zellextrakte.

Zur Befreiung des rohen Zellextraktes von Salzen und sonstigen störenden Bestandteilen wird an Ionenaustauscherharz chromatographiert. Dazu verwenden wir nach Schultz (245) Bio-Rad AG1-X8 Harz, 100-200 mesh, in der Cl^- -Form. Eluiert wird mit 0,1 N HCl. Die Abhängigkeit der eluierten cAMP-Menge von der Säulenlänge wurde bei 5 und bei 9 ml Elutionsvolumen gemessen (Abb. 56 a). Eine Säulenlänge von 4 cm bei 0,5 cm Durchmesser (Pasteurpipetten mit aufgesetzten Plastiktrichtern) hat sich als günstig erwiesen, auch für die Chromatographie von cAMP-haltigen Medien. Die ersten 5 ml enthalten bei einer Säulenlänge von 4 cm rund 90 % der aufgetragenen Radioaktivität. Erst nach 9 ml ist die Ausbeute praktisch quantitativ. Zugunsten einer kürzeren Lyophilisationszeit haben wir uns auf ein Elutionsvolumen von 5 ml beschränkt. Im Waschwasser (die Säulen werden nach dem Auftragen der Proben mit 10 ml Wasser gewaschen) wird kein cAMP gefunden.

cAMP, cGMP, AMP und ADP werden auf diese Weise nicht vollständig voneinander getrennt. Nur ATP bleibt unter diesen Bedingungen auf der Säule und wird erst mit 1 N HCl eluiert. Da jedoch - wenn man von den in der Zelle herrschenden cGMP-, AMP- oder ADP-Spiegeln ausgeht - nur cAMP vom Bindungsprotein akzeptiert wird (Tabelle 26), wurde diese Reinigungsmethode bisher bei fast allen reinen cAMP-Bestimmungen benützt. Aus

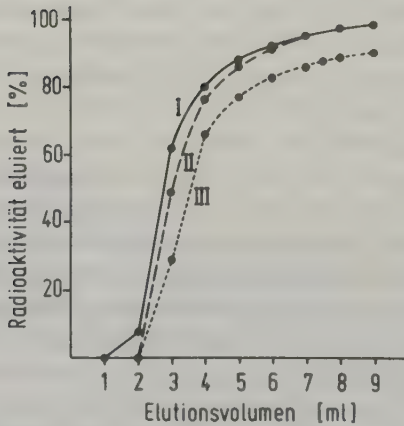
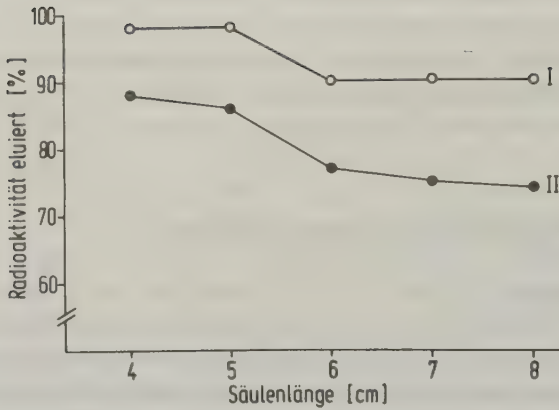


Abb. 56 a. Elution von cAMP aus einer Bio-Rad AG1-X8 Säule (100-200 mesh, Cl⁻-Form) in Abhängigkeit von der Säulenlänge. Elution mit 5 ml (Kurve II) oder 9 ml (Kurve I), 0,1 N HCL.

Abb. 56 b. Elution von cAMP in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen. Säule wie oben. Kurve I: 4 cm Säulenlänge, Kurve II: 5 cm, Kurve III: 6 cm.

Tab. 26 kann man die hohe Spezifität des cAMP-Bindungsprotein erkennen. Adenin, Adenosin und AMP reagieren nicht einmal bei sehr hohen Konzentrationen nennenswert mit dem Bindungsprotein. ADP reagiert erst bei 100000-fachem Überschuß, ATP, das ohnehin unter den von uns verwendeten Bedingungen nicht von der Säule eluiert wird, erst bei 10000-fachem. Nur cGMP reagiert schon bei 10-fachem Überschuß. Da die cGMP-Konzentrationen in der Zelle im allgemeinen eine Größenordnung unter denen von cAMP liegen, stört cGMP selbst dann nicht, wenn sein Spiegel hormonell erhöht ist. Es werden dann maximal 10 pMol cGMP/mg Protein erreicht. Für cAMP-Messungen kann man deshalb auf die Abtrennung von cGMP und anderen Nucleotiden verzichten.

In letzter Zeit messen wir cAMP und cGMP parallel. Diese beiden Nucleotide lassen sich an AG1-X2 Harz, 200-400 mesh, Cl^- -Form, wie folgt trennen (246). Nach dem Auftragen der Probe auf die Säule (0,5x4 cm) wird mit 10 ml Wasser gewaschen. Dann wird mit 5 ml 0,05 N HCl eluiert, um das cAMP zu erhalten. Mit weiteren 5 ml 0,5 NHCl eluiert man das cGMP. Die Trennung ist ausreichend, wenn die cAMP-Spiegel niedrig sind (unter 100 pMol pro Platte). Ist dies nicht der Fall, muß die cGMP-Fraktion re-chromatographiert werden (246). Dazu wird zunächst mit 1 M Tris-Lösung neutralisiert. Schon geringe Mengen cAMP in der cGMP-Fraktion können bei der cGMP-Messung zu Artefakten führen, da das cGMP-Bindungsprotein cAMP fast ebenso gut akzeptiert wie cGMP.

Aus praktischen Gründen und auch deshalb, weil die Elutionsausbeute für cAMP mit 5 ml 0,05 N HCl an der AG1-X2 Säule etwas größer ist als an der AG1-X8 Säule mit 0,1 N HCl, werden wir für künftige Messungen nur noch ersteres Harz verwenden, auch wenn nur die cAMP-Fraktion interessiert.

Die Säuleneluatate werden in Plastiksintillationsgefäßen aufgefangen und für die anschließende Lyophilisation eingefroren.

Tab. 26. Spezifität des cAMP-Bindungsproteins.

eingesetzte Verbindung	-log [Konzentration (M)]	Absolutmenge [pMol]	cAMP gemessen [pMol]
cAMP	8	2	2
Adenin	7	20	0,2
	6	200	0,2
	5	2000	0,3
Adenosin	7	20	0,1
	6	200	0,3
	5	2000	0,3
	4	20000	0,4
AMP	7	20	0,2
	6	200	0,1
	5	2000	0,1
	4	20000	0,1
	3	200000	0,9
ADP	7	20	0,2
	6	200	0,2
	5	2000	0,1
	4	20000	0,3
	3	200000	17,9
ATP	7	20	0,3
	6	200	0,4
	5	2000	0,3
	4	20000	1,6
	3	200000	5,0
cGMP	7	20	1,1
	6	200	8,8
	5	2000	88,3
	4	20000	565,5
	3	200000	802,7
DBCA	7	20	0,7
	6	200	2,4
	5	2000	12,4
	4	20000	103,9
	3	200000	554,5
DBCG	7	20	0,2
	6	200	0,2
	5	2000	0,3
	4	20000	2,0
	3	200000	65,3

b) Inkubationsmedien.

Die Kapazität der AGI-X8 Säule (0,5x4cm) ist auch zur chromatographischen Reinigung des im Inkubationsmedium enthaltenen cAMP ausreichend. 5 ml Inkubationsmedium werden auf die Säule gegeben. Dann wird mit 20 ml Wasser gewaschen, um Salze zu entfernen. Anschließend wird mit 5 ml 0,1 N HCl das cAMP eluiert. Hierbei entwickeln sich wegen des NaHCO_3 -Gehaltes des Mediums CO_2 -Blasen in der Säule. Diese können jedoch leicht entfernt werden und stören das Elutionsverhalten der Säule nicht. Selbstverständlich kann man das CO_2 auch vor Auftragen auf die Säule durch Ansäuern des Mediums entfernen, was jedoch zeitaufwendiger ist. Außerdem darf der pH-Wert nie unter 5 sinken, da sonst beim Waschen der Säule starke Selbstelution auftritt.

c) Regenerierung der Säulen.

Dazu werden die Säulen mit 10 ml 5 N HCl behandelt und anschließend mit 20 ml Wasser wieder neutral gewaschen. Damit sind die Säulen wieder aufnahmebereit. Wir benützen die Säulen etwa 10x ohne Ausbeuteverluste oder sonstige Nachteile hinnehmen zu müssen.

3. Proteinbindungstest.

Die in den Plastiksintillationsgefäßen aufgefangenen Säuleneeluete werden vollständig lyophilisiert. Um 100-200 Proben zugleich lyophilisieren zu können, werden diese auf heizbare Platten unter eine auf den Lyophilisator gesetzte Plastikhaube gestellt. Werden die Heizplatten auf 20°C gehalten, ist die Lyophilisation von 200 Proben über Nacht beendet.

Das Lyophilisat wird in einer geeigneten Menge von bidestilliertem Wasser aufgenommen (z.B. 500 μ l). Ein Aliquot, meist 50%, wird für den cAMP-Test entnommen. In die Plastiksintillationsgefäße werden sodann 10 ml eines Triton X100-haltigen Szintillators gegeben (z.B. Rotiszint), um die Ausbeute zu bestimmen. Diese liegt im allgemeinen zwischen 60 und 80 %.

Es werden jeweils 25 μ l zur cAMP-Bestimmung (123) eingesetzt. Liegt der Gehalt an cAMP in 25 μ l zwischen 0 und 100 pMol, braucht nicht verdünnt zu werden, da diese Menge im linearen Bereich der Eichkurve liegt. Da anfänglich bei Verwendung von Glasgefäßen für die Inkubation die gemessenen cAMP-Werte stark schwankten, weil wahrscheinlich wechselnde Mengen cAMP oder Bindungsprotein unspezifisch an Glaswände adsorbiert wurden, sind wir dazu übergegangen, nur noch Plastikgefäße (Eppendorf) für die Inkubationen zu verwenden. Außerdem erwies sich eine Zugabe von 0,1 % Serumalbumin zu allen Reagenzien (3 H-cAMP, cAMP, Bindungsprotein) als sehr nützlich zur Vermeidung unspezifischer Adsorption. Darüber hinaus erhöhte sich die Bindungskapazität des Bindungsproteins um 10 %.

Die Bestandteile der Inkubation werden nach folgendem Schema einpipettiert (Tab. 27). Das 3 H-cAMP wird so verdünnt, daß in 10 μ l ca. 20000 cpm enthalten sind (0,1 %ige Lösung von RSA in H_2O). Das eingegebene Bindungsprotein bindet ca. 50 % der Radioaktivität (10000 cpm). Für die Eichkurve wird eine cAMP-Vorratslösung mit einer Konzentration von 0.5 pMol/ μ l hergestellt. Davon werden zwischen 4 und 80 μ l (2 bis 40 pMol cAMP) eingesetzt. Bei dem Puffer handelt es sich um einen 0,2 M Acetatpuffer pH 4,0 (20°C). Das Gesamtvolumen beträgt 0,2 ml. Die Reaktion wird durch Zugabe des Bindungsproteins gestartet. Um größtmögliche Genauigkeit zu gewährleisten, werden 3 H-cAMP, cAMP und Bindungsprotein mit μ l-Spritzen einpipettiert. Die Inkubationszeit beträgt 70-80 min bei einer Temperatur von 0-4°C. Es kann jedoch auch über Nacht inkubiert werden

Tab. 27. Pipettierschema für den cAMP-Test

(in der Reihenfolge des Einpipettierens aufgeführt).

Probe Nr.	³ H-cAMP 1:200 verd. [μl]	Puffer pH 4,0 [μl]	H ₂ O [μl]	cAMP [μl]	Probe [μl]	Bindungs- protein [μl]	Sonstiges
1	10	50	140	-	-	-	} Leerwert
2			140	-	-	-	
3			100	-	}	40	} Null- standard (Werte I ₀)
4			100	-			
5			100	-			
6			96	4	}		} Eichkurve (Werte I _x)
7			96	4			
8			90	10			
9			90	10			
10			80	20			
11			80	20			
12			60	40			
13			60	40			
14			40	60			
15			40	60			
16			20	80	}		} Proben (Werte I)
17			20	80			
18			75	Z	25		
19			75		25		
20			75		25		

(Kühlraum). Nach Beendigung der Inkubation wird mit 800 μl 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0 verdünnt. Die so verdünnte Lösung wird mit einer Pasteurpipette auf ein Membranfilter aus Celluloseester (24-25 mm Ø, 0,45 μm Porenweite) gegeben. Nachgewaschen wird mit 10 ml 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0. Mit Hilfe einer Pinzette wird das Filter in ein Plastikszintillationsgefäß überführt. Sind alle Proben abgesaugt, werden zur Auflösung des Filters in jedes Szintillationsgefäß zunächst 1 ml Methylcellosolve und anschließend 10 ml

Szintillationsflüssigkeit pipettiert (1875 ml Toluol, 625 ml Methylcellosolve, 10g PPO, 0,5 g POPOP oder ein Triton X100-haltiger Szintillator wie z.B. Rotiszint). Nach sorgfältigem Umschütteln (wichtig!) werden die Proben im Flüssigkeits-szintillationsspektrometer unter Abzug des Leerwertes (15-50 cpm) 5 min gezählt.

Der Quotient I_o/I_x aus den Zählraten des Nullstandards (I_o) und der Eichwerte (I_x) (siehe auch Tab. 27) wird gegen die jeweiligen Eichmengen cAMP (pMol) aufgetragen. Man erhält eine Gerade (Abb. 14), mit deren Hilfe der cAMP-Gehalt der zu messenden Proben ermittelt werden kann. Dazu muß der Quotient I_o/I gebildet werden. Bei der Auswertung der Daten (ausgedrückt in pMol cAMP/mg Protein) müssen noch Extraktionsausbeuten, Verdünnungsfaktor und Proteinmenge pro Platte berücksichtigt werden. Ergebnisse werden mit dem Sony-Tischrechner SOBAX 2550 berechnet.

V. Prostaglandinbestimmung.

1. Zellinkubation mit Vorläuferfettsäuren.

Die Prostaglandinsynthese aus Vorläuferfettsäuren wurde an Ratten-Gliomazellen C6-BU-1 studiert. Das serumhaltige Wachstumsmedium wurde durch 20 ml DMEM/100 μ M BUDR ersetzt. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt. FCS wurde weggelassen, weil es unbekannte Mengen an essentiellen Fettsäuren enthält. Gliomazellen haben die Eigenschaft, auch ohne Serum weiterzuleben, sobald sie eine höhere Zelldichte erreicht haben. 16 h nach Mediumwechsel wurden 15 ml des Mediums entfernt, 50 μ l einer 1 mM Lösung von 14 C-DHGLS in Äthanol (spezifische Radioaktivität 18,5 mCi/mMol) ins restliche Medium pipettiert und die Zellen 1 h bei 37°C im Inkubator inkubiert (10 % CO₂, ca. 100 % Feuchtigkeit). Dann wurde die Plastikpetrischale mit den inkubierten Zellen auf Eis gestellt, das Medium abgenommen und der Zellrasen gewaschen und geerntet (Kapitel C.III.2.4). Diese Vorschrift gilt, wenn die Prostaglandinsynthese aus radioaktiven Vorläufern gemessen werden soll. Zur Messung der aus Vorläuferfettsäuren gebildeten Prostaglandine nach dem RIA-Verfahren wurde an Parallelplatten genauso gearbeitet, nur daß statt der 14 C-DHGLS die entsprechende Menge nichtradioaktive DHGLS eingesetzt wurde.

2. Extraktion der Prostaglandine aus biologischem Material.

Die folgende Extraktionsmethode lehnt sich an die von B. Jaffe beschriebene an (103,104).

- 1) Gewebekulturmedium oder Zellhomogenat wird in ein Zentrifugenglas gegeben (Eiskühlung).
- 2) Für Messung der Umwandlung radioaktiver Vorläufer: Kalte Trägersubstanzen (je 10 μ l einer 1 mM Vorratslösung von PGA₁, PGE₁ oder PGF_{1 α} in 95 %igem Alkohol) zupipettieren;

außerdem zur Messung der Extraktions- und Elutionsausbeuten je nach Art der radioaktiven Markierung des verwendeten Vorläufers ^3H -Prostaglandine oder ^{14}C -PGE₁ (andere ^{14}C -markierte Prostaglandine sind nicht käuflich zu erwerben) (ca. 5-10000 cpm). Auf letzteres kann verzichtet werden, wenn man nur ein qualitatives Ergebnis benötigt.

Für das RIA-Verfahren: ^3H -PGE₁ (4-5000 cpm) als internen Standard zur Messung der Ausbeute zugeben.

- 3) 3 ml einer frisch bereiteten Mischung von Äthylacetat: iso-Propanol: 0,1 N HCl (3:3:1) zugeben und gut (zweimal ca. 15 sec) mischen (Whirlmix).
- 4) 2 ml Äthylacetat und 3 ml H₂O zusetzen, Zentrifugengläser mit Plastikkappe verschließen und gut (!) schütteln.
- 5) 5 min bei Stellung 90 % (Roto-Silenta K) zentrifugieren (ca. $3 \times 10^3 g$) wobei 3 Phasen entstehen: oben Äthylacetat, dann H₂O, dann Proteinniederschlag (falls Zellhomogenat extrahiert wird).
- 6) Die Äthylacetatphase möglichst quantitativ in ein Plastikreagenzglas (17x100mm) überführen. Ein kleiner Rest läßt sich nicht abheben. Der hierdurch verursachte Fehler ist zu klein, um ins Gewicht zu fallen. Bei 57°C im Wasserbad im Stickstoff-Strom zur Trocknung bringen. Die Proben können in dieser Form bei -20°C aufbewahrt werden.

3. Trennung der Prostaglandine in die drei Hauptgruppen.

Die Auftrennung der Prostaglandine in drei Gruppen, nämlich

- 1) PGA, PGB und Vorläuferfettsäuren,
- 2) PGE₁ und PGE₂ und
- 3) PGF_{1 α} und PGF_{2 α} soll beschrieben werden (103,104).

Man benötigt folgende Lösungsmittel (LM):

- LM I : Benzol:Äthylacetat:Methanol (60:40:10)
LM II : Benzol:Äthylacetat:Methanol (60:40:20)
LM III : Benzol:Äthylacetat (60:40)

LM IV: Benzol:Äthylacetat:Methanol (60:40:2)

Arbeitsvorschrift:

- 1) Kieselsäure (Sigma, SIL-R, 100-300 mesh) in LM III suspendieren (Magnetrührer) (0,25 g/ml).
- 2) Säulen (10 ml Einwegglaspipetten) an der Null-Marke abbrechen (Glasschneider) und am Auslauf mit kleinem Propfen aus Quarzwolle versehen.
- 3) Säulen mit 5 ml Methanol waschen und von der gut mit einem Magnetrührer gemischten Kieselsäure-Suspension 2 ml (=0,5g) entnehmen und in die Säule geben. Gut setzen und Lösungsmittel auslaufen lassen.
- 4) Säule mit 5 ml LM IV waschen.
- 5) Säule mit 1,5 ml LM III waschen.
- 6) Lipidextrakt in den Plastikröhrchen in 0,2 ml LM I lösen (Whirlmix) und mit 0,6 ml LM III mischen. Sodann Inhalt mit Pasteurpipetten sorgfältig auf Säule aufsetzen. Die nach dem Aufsetzen die Säule verlassende Flüssigkeit enthält bereits einen Teil der Vorläuferfettsäuren.
- 7) Röhrchen mit 0,2 ml LM III waschen, auf die Säule geben und Säule auslaufen lassen. In der auslaufenden Flüssigkeit sind ebenfalls Vorläuferfettsäuren enthalten.
- 8) Säule mit 7 ml LM III eluieren. Diese Fraktion enthält PGA, PGB und Vorläuferfettsäuren.
- 9) Säule mit 13 ml LM IV eluieren. Diese Fraktion enthält PGE.
- 10) Säule mit 4 ml LM II eluieren. Diese Fraktion enthält PGF.

Das Ergebnis einer solchen Trennung ist in Abb. 6 gezeigt. Die aufgefangenen Fraktionen mit den Prostaglandinen werden im Stickstoffstrom bei 57°C im Wasserbad zur Trockene gebracht und dann weiterverarbeitet. Hier kann unterbrochen werden, wenn man die Proben im Tiefgefrierschrank aufbewahrt (-20°C).

4. Messung der Prostaglandinsynthese durch Umwandlung von radioaktiven Vorläuferfettsäuren.
Dünnschichtchromatographie.

Die zur Trockne gebrachten Fraktionen mit den radioaktiven Umwandlungsprodukten werden in je 100 μ l LM II aufgenommen und in Eis aufbewahrt. Die Fraktionen werden dann einzeln auf Dünnschicht-Fertigplatten (Kieselgel G) aufgetragen zusammen mit entsprechendem Referenzmaterial (je 30 μ l). In einigen im Text angegebenen Fällen (z.B. zur Untersuchung der Vorläufer auf radiochemische Reinheit) wurden AgNO_3 -imprägnierte Platten verwendet, mit deren Hilfe man cis-trans-Isomere und Verbindungen, die nur um eine Doppelbindung verschieden sind, unterscheiden kann. Die Herstellung der AgNO_3 -imprägnierten Platten sei kurz beschrieben (108).

a) selbstgestrichene Platten:

23,75 g Kieselgel G in einer Lösung von 1,25 g AgNO_3 in 50 ml Wasser aufschlämmen und sofort auf sorgfältig entfettete Glasplatten auftragen. Platten ca. 30 min abtrocknen lassen und dann bei 100°C 1 h trocknen. Die Menge ist ausreichend für 4 Platten 20x20 cm. Sie sollten innerhalb von 24 h verwendet und im Dunkeln aufbewahrt werden.

b) aus Fertigplatten:

Dünnschicht-Fertigplatten 20x20 werden intensiv mit 15%iger wässriger AgNO_3 -Lösung besprüht. Sonst gilt das oben Gesagte.

Die Platten werden in Äthylacetat: Benzol:Essigsäure: iso-Octan:Wasser (8:3:1:3:10) (System AIV) (105) entwickelt (obere Phase). Die Trennergebnisse sind in nicht mit Lösungsmittel äquilibrierten Kammern günstiger als in äquilibrierten. Nach kurzem Abtrocknen an Luft wird bei 50°C getrocknet. Die unmarkierten Referenzsubstanzen werden im Falle von AgNO_3 -behandelten Platten durch Besprühen mit Schwefelsäurereagenz Nr.

217 A (247), sonst mit Jod-Dampf sichtbar gemacht. Zur Analyse der Radioaktivität auf den Platten wird die Kieselsäureschicht mit einem Dünnschicht-"Scraper" fraktionsweise abgekratzt, in einem Szintillationsgefäß gesammelt und durch Zusatz von 2ml LM II eluiert, bevor 10 ml Szintillationsflüssigkeit (4g PPO, 0,2g Dimethyl-POPOP in 1 l Toluol) zupipettiert werden. Die Radioaktivität wird im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer mit Einfachmarkierungs- oder - falls ein entsprechender interner Standard zur Messung der Ausbeute vorhanden ist - mit Doppelmarkierungseinstellung gemessen. Letztere Methode erlaubt es, mit dem einen Kanal die Radioaktivität des internen Standards (Ausbeutebestimmung) und mit dem anderen Kanal die des Vorläufers oder des gebildeten Produktes zu messen.

5. Absolutbestimmung von Prostaglandinen mit Hilfe der radioimmunologischen Bestimmungsmethode.

5.1. Herstellung von Antikörpern.

Dazu mußte Prostaglandin an ein geeignetes Protein, in unserem Falle RSA, gebunden werden. Die Prostaglandin-RSA-Konjugate wurden in Anlehnung an die Vorschrift von B. Jaffe (104) hergestellt. Gewöhnlich müssen die zur Herstellung der Antikörper verwendeten Tiere (Kaninchen, Ziegen oder Meerschweinchen) viermal mit einer Emulsion (Freundsches Adjuvans), die das Prostaglandin-RSA-Konjugat enthält, immunisiert werden. Dabei werden folgende Mengen Konjugat eingesetzt (Immunisierung von Ziegen):

- | | |
|--------------|---------|
| 1. Injektion | 0,15 mg |
| 2. Injektion | 2,0 mg |
| 3. Injektion | 0,5 mg |
| 4. Injektion | 0,5 mg. |

Da die Ausbeuten bezüglich Prostaglandin bei der Kupplungsreaktion von Prostaglandin an RSA bei 30 % liegen, müssen

pro Ansatz ca. 10 mg Prostaglandin eingesetzt werden.

Zunächst werden folgende Lösungen bzw. Lösungsmittel hergestellt:

Dioxan

wird zur Trocknung und Reinigung über eine Aluminiumoxidsäule, basisch (Aktivität I, 80-200 mesh), gegeben.

Dioxan - Triäthylamin

0,1 ml Triäthylamin und 2,06 ml Dioxan werden in einem Zentrifugenglas mit Plastikstopfen gemischt.

Dioxan - Äthylchloroformat

0,1 ml Chlorameisensäureäthylester und 1,56 ml Dioxan werden in einem Zentrifugenglas mit Plastikstopfen gemischt.

RSA - Lösung

275 mg RSA (Crystallized bovine plasma albumin, Metrix clinical and diagnostics division, Chicago, Illinois) werden in 10 ml 0,1 N NaHCO_3 gelöst.

Nun folgt die eigentliche Konjugationsreaktion (Abb. 57), die im Folgenden für jedes hergestellte Konjugat getrennt beschrieben wird.

PGE₁ - RSA

10,2 mg PGE₁ und 100 μl ^3H -PGE₁ (1:100 verdünnt in H_2O , ca. 250 000 dpm) wurden in einem Zentrifugenglas 10x11 cm in 0,5 ml Dioxan gelöst und lyophilisiert. Nach Aufnahme in 0,5 ml Dioxan wurden 100 μl Dioxan-Triäthylamin-Lösung und 50 μl Dioxan-Äthylchloroformat zugegeben. Beim Erwärmen mit der Hand entstand ein farbloser Niederschlag ($\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{HCl}$). Die Lösung wurde auf 4°C abgekühlt und dann unter Rühren (Whirlmix) mit

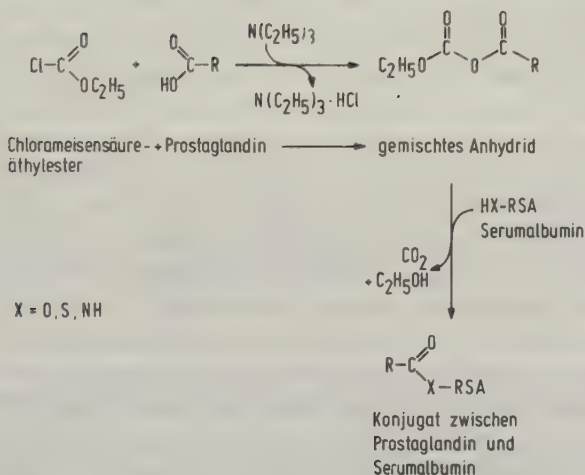


Abb. 57. Konjugation von Prostaglandin an RSA (schematisch).

2 ml RSA in 0,1 N NaHCO_3 versetzt. Zuerst entstand eine farblose Trübung, die nach kurzer Zeit wieder verschwand. Ca. 30 min später wurde das Konjugat gegen 1 l 0,01 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,2, der 1,14 % KCl enthielt, 24 h dialysiert. Pufferwechsel erfolgte nach 12 h. Mit Hilfe eines Aliquots, das aus dem Dialysat entnommen wurde, konnte berechnet werden, daß 27 Moleküle PGE_1 pro Molekül RSA gebunden wurden.

PGF_{2α} - RSA

10,4 mg PGF_{2α} wurden mit 100 µl ³H-PGE₁ (1:100 verdünnt, s.o.) versetzt und lyophilisiert. Der Rückstand wurde mit 0,5 ml Dioxan versetzt. Das PGF_{2α}, das als Tromethamin-Salz (2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propan-diol) vorlag, löste sich nicht. Nun wurden 100 µl Triäthylamin-Dioxan und 50 µl Äthylchloroformat-Dioxan zugefügt. Erst nach 10 min (Erwärmung mit der Hand) setzte Reaktion ein. Jedoch lösten sich einige Klumpen im Reagenzglas noch nicht auf, auch nicht, als vor Einsetzen der Reaktion nochmals Triäthylamin-Dioxan und Äthylchloroformat-Dioxan zugesetzt wurden. Nun wurden 0,2 ml Dimethylsulfoxid zugesetzt, worauf alles in Lösung ging. Nach weiteren 20 min bei Zimmertemperatur wurde zur vorher auf 4°C gekühlten Lösung des gemischten Anhydrids rasch unter starkem Rühren 2 ml eiskalte RSA-Lösung (27,5 mg/ml) zugesetzt. Die Lösung trübte sich nicht. Nach 1 h wurde dialysiert (siehe PGE₁-RSA). Es wurden 12 Moleküle PGF_{2α} pro Molekül RSA gebunden.

PGA₁ - RSA

8,1 mg PGA₁ wurden mit 100 µl ³H-PGE₁ (1:100 verdünnt, s.o.) versetzt und lyophilisiert. Nach Aufnahme des Rückstands in 0,5 ml Dioxan wurden 100 µl Triäthylamin-Dioxan und 50 µl Äthylchloroformat-Dioxan zugegeben. Bei Erwärmung mit der Hand erschien ein farbloser Niederschlag. Nach 5 min wurden 2 ml RSA-Lösung (27,5 mg/ml) bei 4°C unter starkem Rühren zugegeben. Es entstand eine leichte Trübung, die jedoch nach einigen Minuten wieder verschwand. Nach 30 min bei 4°C wurde dialysiert. In diesem Falle wurden 25 Moleküle PGA₁ pro Molekül RSA gebunden.

In einem zusätzlichen Experiment wurde geprüft, wieviel von dem an das RSA gebundenen Prostaglandin kovalent gebunden

und wieviel nur adsorbiert war. Dazu wurde ein Aliquot eines RSA-PGE₁-Konjugats, bei dem 25,3 Mol PGE₁ pro Mol RSA gebunden waren, mit Äthylacetat:iso-Propanol:0,1 N HCl (3:3:1) extrahiert (vgl. C.V.2). Der Radioaktivitätsgehalt des Extraktes zeigte an, daß nur 0,5 % des gebundenen PGE₁ nicht kovalent gebunden waren.

Die Dialysate wurden in der für die Immunisierung passenden Weise aufgeteilt und lyophilisiert. Die lyophilisierten Konjugate wurden in Trockeneis verpackt an F. Hertelendy (Saint Louis University, School of Medicine) geschickt. Dort wurden Ziegen immunisiert.

5.2. Bindungskapazität von Antiseren gegen PGA, PGE und PGF.

Die Antiseren wurden auf ihre Bindungskapazität untersucht. Folgende Lösungen und Präparate werden dazu benötigt:

1) Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

30 ml 5 M NaCl (29,2g NaCl pro 100 ml Lösung)

10 ml 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4

10 ml 0,02 % NaN₃

auf 1000 ml mit H₂O auffüllen.

2) PBS mit 1 mg/ml Gelatine (GPBS 1 mg/ml)

0,5 g Gelatine in 500 ml PBS lösen.

3) PBS mit 5 mg/ml Gelatine (GPBS 5 mg/ml)

2,5 Gelatine in 500 ml PBS lösen.

4) Holzkohle

Der Inhalt einer Flasche Holzkohle wird dreimal mit je 500 ml H₂O gewaschen (jeweils mit Waschflüssigkeit unter Rühren aufschlämmen, absetzen lassen und dann dekantieren). Sodann wird zweimal mit je ca. 400 ml PBS gewaschen. Nach dem letzten Abdekantieren wird der Holzkohlebrei bei 160°C getrocknet.

- 5) Holzkohle-Dextran-Mischung
 200 ml PBS
 500 mg Holzkohle (gewaschen)
 50 mg Dextran T 70
- 6) EDTA-Lösung (0,005 mg/ml)
 Dazu 50 mg in 1 l H₂O lösen und mit 1 N KOH auf pH 7,2 einstellen.
- 7) Szintillator für Prostaglandinproben am Ende der Inkubation
 1 l Triton X-100
 2 l Toluol
 21 g PPO
 0,9 g Dimethyl-POPOP
 oder Rotiszint.

Die Bestandteile der Inkubationsmischung werden nach folgendem Schema in der angegebenen Reihenfolge (Tab. 28) in Plastikröhrchen 12x75 mm einpipettiert.

Tab. 28. Pipettierschema für die Bestimmung der Bindungskapazität von Antiseren.

Probe Nr.	³ H-PGX (µl)	GPBS (1mg/ml) (µl)	EDTA (0,05 mg/ml) (µl)	Antikörper PGX (µl)	Verdünnung
1	100	100	50	50	-
2	100	100	50	50	-
3	100	100	50	50	1:100
4	100	100	50	50	1:500
5	100	100	50	50	1:1000

Die lyophilisierten Antiseren wurden entsprechend ihrem ursprünglichen Volumen in bidestilliertem Wasser gelöst. Verdünnt wurden sie mit GPBS (1mg/ml). ³H-PGX wird so mit GPBS (1 mg/ml) verdünnt, daß 100 µl 15-20000 cpm enthalten. Das

Inkubationsvolumen beträgt 300 μ l. Am Ende der Inkubationszeit (60 - 120 min, 4°C) werden 100 μ l kaltes GPBS (5mg/ml) zugesetzt. Anschließend wird 1 ml Holzkohle-Dextran-Suspension zugesetzt, um ungebundenes 3 H-Prostaglandin zu binden. Nach sorgfältigem Mischen (Whirlmix) wird sofort 10 min bei 4°C und 1000 g zentrifugiert (Rotosilenta K). Der Überstand wird möglichst rasch in ein Szintillationsgefäß dekantiert. Nach Zusatz von 10 ml Szintillationsflüssigkeit werden die Proben 5 min im Flüssigkeitsszintillationsspektrometer gezählt.

Tab. 29 zeigt die Bindungskapazitäten verschiedener Prostaglandin-Antikörper. Die Qualität der Seren schwankt je nach Entnahmedatum recht stark. Die PGA-Seren hatten ihre maximale Qualität im Oktober 1973 erreicht, also im 10. Monat nach der ersten Immunisierung. Sie hat dann nur wenig abgenommen. Auch die PGE-Seren hatten im Oktober 1973 ihre höchste Bindungskapazität. Dann allerdings nahm ihre Qualität rapide ab. Die PGF-Seren hatten bereits im Juni 1973 den höchsten Titer, um dann ebenfalls stark abzufallen. Das PGF-Serum aus der letzten Blutung scheint wieder einen besseren Titer zu haben.

Die Lyophilisationsprozedur und das Wiederaufnehmen in Wasser scheint die Bindungskapazität der Seren stark negativ zu beeinflussen. Die Bindungskapazitäten, die uns - vor der Lyophilisation und Verschickung in unser Labor - aus den USA berichtet wurden, sind durchweg um den Faktor 3 bis 10 besser als die von uns gemessenen. Außerdem verschlechtert lange Lagerung bei -20°C, Einfrieren und Auftauen der verdünnten - nicht der unverdünnten - Antiseren die Bindungskapazität stark. Dies gilt vor allem für die Antiseren gegen PGF, weniger für diejenigen gegen PGA und PGE. Deshalb sollten die Antiseren nach entsprechender Verdünnung unbedingt portionsweise (für einen Test ausreichend) abgefüllt werden und in der Flüssigstickstoff-Kühltruhe aufbewahrt werden. Die Inkubationszeiten können ohne Nachteile - wir haben bis zu 15 h inkubiert - verlängert werden.

Tab. 29. Bindungskapazitäten verschiedener Prostaglandin-Antiseren. Eingesetzt wurden 14330 cpm $^3\text{H-PGA}_1$, 14370 cpm $^3\text{H-PGE}_1$ und 16500 cpm $^3\text{H-PGF}_{1\alpha}$.

Serum gegen	Serum vom	Inkubationszeit (min)	Bindung bei Verdünnung (%)				
			1:100	1:500	1:1000	1:3000	1:5000
PGA	6/73	90	59,3	17,6	11,2	3,9	2,4
	10/73	90	59,4	53,3	47,7	26,2	15,8
	letzte Blutentnahme, Datum unbekannt	60	60,7	51,8	42,2	16,3	11,2
PGE	2/73	60	33,0	8,4	6,1	1,2	1,8
	6/73	90	74,9	44,9	25,6	10,9	5,4
	8/73	90	67,7	48,1	25,3	11,0	6,5
	10/73	90	77,0	61,5	53,5	31,1	21,3
	3/74	60	54,7	20,8	17,7	6,1	1,1
	5/75	60	58,1	31,4	20,1	6,1	4,0
	letzte Blutentnahme, Datum unbekannt	60	43,3	12,0	6,7	0,7	-
PGF	6/73	90	71,4	34,5	17,3	6,4	3,6
	8/73	90	32,9	6,1	3,2	1,1	0,8
	10/73	90	25,9	5,1	2,2	0,8	0,4
	letzte Blutentnahme, Datum unbekannt	120 (1:200)	31,2	-	-	-	-

Die Tiere wurden im Januar 1973 erstmals geprüft.

5.3. Erstellung einer Eichkurve und Messung prostaglandin-haltiger Proben.

In Kapitel C.V.3. wurde die Trennung der Prostaglandine in die drei Hauptgruppen beschrieben. Die zur Trockne gebrachten Säuleneluate werden in einer geeigneten Menge GPBS (1 mg/ml) - z.B. 0,5 oder 1 ml - aufgenommen. Ein Aliquot der PGE₁-Fraktion wird zur Bestimmung der Radioaktivität und somit des Ausbeutefaktors entnommen. Dies geschieht unter der Annahme, daß die Ausbeuten von PGA und PGF denen von PGE entsprechen. 50 bis 100 µl der in GPBS aufgenommenen Proben werden - je nach Prostaglandingehalt verdünnt oder unverdünnt - für den RIA eingesetzt. Das Pipettierschema für einen solchen Test ist in Tab. 30 dargestellt (in der Reihenfolge des Einpipettierens aufgeführt). Die für die Eichung nötige Vorratslösung enthält in 100 µl GPBS 50;20;10;5;2;1;0,5;0,2 oder 0,1 pMol Prostaglandin. Vom ³H-PGX müssen ca. 20 000 cpm eingesetzt werden, so daß der Nullstandard (bei rund 40 - 50 % Bindung) 8-10000 cpm beträgt. Das Gesamtvolumen ist 0,3 ml. Inkubation und Aufarbeitung siehe Kapitel C.V.5.2. Bei halb-logarithmischer Auftragung der Eichmengen PGX (kaltes + heißes Material) (pMol) gegen die prozentuale Hemmung der Bindung radioaktiven Prostaglandins $\frac{I_0 - I_x}{I_0} \times 100$ erhält man eine Reihe von Punkten, die auf einer ¹⁰O Geraden liegen (Abb.7). Die zu bestimmenden Proben müssen so weit verdünnt werden, daß ihr Prostaglandingehalt im linearen Bereich der Eichkurve liegt.

VI. Proteinbestimmung.

Protein wurde nach der Methode von Lowry (248) mit RSA als Standard gemessen.

Tab. 30. Pipettierschema für die radioimmunologische Bestimmung von Prostaglandinen.

Probe Nr.	³ H-PGX [μl]	PGX [pMol/ 0,1ml]	Probe [μl]	GPBS (1mg/ml) [μl]	EDTA (0,05 Körper mg/ml) [μl]	Anti- körper Verd.:1:x [μl]	Sonstiges
1	100	-	-	150	50	-	} Leerwert
2	100	-	-	150	50	-	
3	100	-	-	100	50	50	} Nullstandard (Werte I ₀)
4	100	-	-	100	50	50	
5	100	0,1	-	-	50	50	} Eichkurve (Werte I _x)
6	100	0,1	-	-	50	50	
7	100	0,2	-	-	50	50	
8	100	0,2	-	-	50	50	
23	100	-	100	-	50	50	} Proben
24	100	-	100	-	50	50	

D. ZUSAMMENFASSUNG.

- 1) An Ratten-Gliomazellen wurde die Prostaglandinsynthese aus radioaktiver und nichtradioaktiver Dihomo- γ -linolen- oder Arachidonsäure untersucht. Die gebildeten Prostaglandine A, E und F wurden isoliert und anhand ihrer Radioaktivität oder mit Hilfe des Radioimmunoassay quantifiziert.
- 2) Prostaglandin E_1 (PGE_1) erhöht den cAMP-Spiegel in Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen innerhalb von 10 min (Kurzzeitinkubation) auf das 30-100-fache (halbmaximale Stimulierung bei 20 nM). Adenosin wirkt qualitativ wie PGE_1 .
- 3) Narkotica (Opiate wie Morphin; Methadon) sowie Acetylcholin und Noradrenalin bzw. ihre Analoga hemmen in niedriger Konzentration diese Wirkung des PGE_1 .
- 4) Der Effekt der Opiate ist streng stereospezifisch und wird durch den spezifischen Opiat-Antagonisten Naloxon verhindert. Atropin hemmt die Wirkung des Acetylcholins (muscarinischer cholinergischer Rezeptor), Phentolamin die des Noradrenalins (α -adrenerger Rezeptor).
- 5) Hemmstudien zeigen, daß die Rezeptoren für PGE_1 , Opiate, Acetylcholin und Noradrenalin verschiedene Moleküle sein müssen.
- 6) Morphin, Acetylcholin und Noradrenalin verhindern die Steigerung des cAMP-Spiegels nicht durch Erhöhung der cAMP-Phosphodiesterase-, sondern durch Erniedrigung der Adenylatcyclase-Aktivität.
- 7) Morphin, Acetylcholin und Noradrenalin erhöhen den cGMP-Spiegel (R.J. Gullis). Das cGMP ist mit großer Wahrscheinlichkeit nicht für die Senkung der Adenylatcyclase-Aktivität verantwortlich.
- 8) Nach Langzeitinkubation mit PGE_1 ($> 4h$) haben Hybridzellen ihre Fähigkeit verloren, ihren cAMP-Spiegel in Gegenwart von PGE_1 zu erhöhen. Der Grund hierfür liegt in einer starken Erhöhung der cAMP-Phosphodiesterase-Aktivität.

- 9) Langzeitinkubation (> 6h) mit Morphin, einem geeigneten cholinergen oder adrenergen Agonisten erhöht den maximalen cAMP-Spiegel, der in Anwesenheit von PGE_1 erreicht werden kann, auf das Mehrfache.
- 10) Diese und damit im Zusammenhang stehende Erscheinungen lassen sich als biochemische Korrelate von Morphintoleranz, - entzugssyndrom und -abhängigkeit interpretieren. Diese Ergebnisse verlängern die Liste neuronaler Eigenschaften, die an den Modellneuronen Neuroblastoma x Glioma-Hybridzellen beobachtet wurden.
- 11) Verschiedene Mechanismen für den Zusammenhang zwischen Kurz- und Langzeitwirkung von Morphin, adrenerger und cholinерger Agonisten werden diskutiert.

E. LITERATURVERZEICHNIS.

- (1) Krnjevic, K., *Physiol. Revs.* 54, 418 (1974).
- (2) Llinas, R.R., *Sci. Amer.* 232, 56 (1975).
- (3) *Biology of Neuroglia, Progress in Brain Research*, Vol. 15, herausgegeben von E.D.P. de Robertis und R. Carrea, Elsevier Publishing Company (1965).
- (4) Glees, P., in *Neuroglia, morphology and function*, Blackwell Scientific Public., Oxford (1955).
- (5) Hager, Allgemeine morphologische Pathologie des Nervengewebes, in *Handbuch der allgemeinen Pathologie*, 3. Band, 3. Teil, S. 166-180, Springer-Verlag (1968).
- (6) Murray, M., in W. Windle, Herausgeber, "Biology of Neuroglia", Charles C. Thomas Publ., Springfield, Ill. (1958).
- (7) Orkand, R.K., Nicholls, J.G. and Kuffler, S.W., *J. Neurophysiol.* 29, 789-806 (1966).
- (8) Villegas, J., *J. Physiol. (Lond.)*, 225, 275 (1972).
- (9) Villegas, J., *J. Physiol. (Lond.)*, 232, 193 (1973).
- (10) Villegas, J., *J. Physiol. (Lond.)*, 242, 647 (1975).
- (11) Hydén, H. und McEwen, B.S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 55, 354 (1966).
- (12) Moore, B.W. und McGregor, D., *J. Biol. Chem.* 240, 1647 (1965).
- (13) Oksche, A., *Z. Zellforsch.* 48, 74 (1958).
- (14) Herschman, H.R., *Res. Meth. Neurochem.* 2, 101 (1974).
- (15) Buonassisi, V., Sato, G. und Cohen, A.J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 48, 1184 (1962).
- (16) Yamamura, Y., Tashjian, A.H. jr. und Sato, G., *Science* 154, 1186 (1966).
- (17) Augusti-Tocco, G. und Sato, G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 64, 311 (1969).
- (18) Tumilowicz, J.J., Nichols, W.W., Cholon, J.J. und Greene, A.E., *Cancer Res.* 30, 2110 (1970).
- (19) Schubert, D., Heinemann, S., Carlisle, W., Turikas, H., Kimes, B., Patrick, J., Steinbach, J.H., Culp, W. und Brandt, B.L., *Nature* 249, 224 (1974).

- (20) Amano, T., Richelson, E. und Nirenberg, M., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 69, 258 (1972).
- (21) Rosenberg, R.M., Vandeventer, L., Defrancesco, L., und Friedkin, M.E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 68, 1436 (1971).
- (22) Harkins, J., Arsenault, M., Schlesinger, K. und Kates, J., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 69, 3161 (1972).
- (23) Siman-Tov, R. und Sachs, L., Eur. J. Biochem. 30, 123 (1972).
- (24) Prasad, K.N., Mandal, B., Waymire, J.C., Lees, G.J., Vernadakis, A. und Weiner, N., Nature New Biol. 241, 117 (1973).
- (25) Hamprecht, B. und Amano, T., Anal. Biochem. 57, 162 (1974).
- (26) Waymire, J.C., Weiner, N. und Prasad, K.N., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 69, 2241 (1972).
- (27) Breakefield, X.O. und Nirenberg, M.W., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 71, 2530 (1974).
- (28) Anagnoste, B., Freedman, L.S., Goldstein, M., Bromme, J. und Fuxe, K., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 69, 1883 (1972).
- (29) Mandel, P., Ciesielski-Treska, J., Hermetet, J.C., Zwiller, J., Mack, G. und Goridis, C., Biochem. Pharmacol. Suppl. 1, 209 (1973).
- (30) Hamprecht, B., Traber, J. und Lamprecht, F., FEBS Lett. 42, 221 (1974).
- (31) Seeds, N.W., Gilman, A.G., Amano, T. und Nirenberg, M., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 66, 160 (1970).
- (32) Klebe, R.J. und Ruddle, F.H., J. Cell Biol. 43, 690 (1969).
- (33) Schubert, D., Humphreys, S., Baroni, C. und Cohn, M., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 64, 316 (1969).
- (34) Furmanski, P., Phillips, P.G. und Lubin, M., Nature 233, 413 (1971).
- (35) Prasad, K.N., und Hsie, A.W., Nature 233, 141 (1971).
- (36) Prasad, K.N., Nature, 234, 471 (1971).

- (37) Prasad, K.N. und Sheppard, J.R., *Exp. Cell Res.* 73, 436 (1972).
- (38) Prasad, K.N., *Nature New Biol.* 236, 49 (1972).
- (39) Nelson, P., Ruffner, W. und Nirenberg, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 64, 1004 (1969).
- (40) Nelson, P.G., Peacock, J.H., Amano, T. und Minna, J., *J. Cellul. Physiol.* 77, 337 (1971).
- (41) Harris, A.J. und Dennis, M.J., *Science* 167, 1253 (1970).
- (42) Nelson, P.G., Peacock, J.H. und Amano, T., *J. Cellul. Physiol.* 77, 353 (1971).
- (43) Peacock, J. und Nelson, P.G., *J. Neurobiol.* 4, 363 (1973).
- (44) Gilman, A.G. und Nirenberg, M., *Nature* 234, 356, (1971).
- (45) Hamprecht, B. und Schultz, J., *FEBS Lett.* 34, 85 (1973).
- (46) Sahu, S.K. und Prasad, K.N., *J. Neurochem.* 24, 1267 (1975).
- (47) Schultz, J. und Hamprecht, B., *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharmacol.* 278, 215 (1973).
- (48) Blume, A., Dalton, C. und Sheppard, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 70, 3099 (1973).
- (49) Traber, J., Fischer, K., Buchen, C. und Hamprecht, B., *Nature* 255, 558 (1975).
- (50) Traber, J., Reiser, G., Fischer, K. und Hamprecht, B., *FEBS Lett.* 52, 327 (1975).
- (51) Gullis, R., Traber, J., Fischer, K., Buchen, C. und Hamprecht, B., *FEBS Lett.* 59, 74 (1975).
- (52) Gullis, R., Traber, J., Fischer, K., Buchen, C. und Hamprecht, B., in Vorbereitung.
- (53) Matsuzawa, H. und Nirenberg, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 72, 3473 (1975).
- (54) Prasad, K.N., Gilmer, K.N. und Sahu, S.K., *Nature* 249, 765 (1974).
- (55) Prasad, K.N. und Gilmer, K.N., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 71, 2525 (1974).

- (56) Traber, J., Fischer, K., Latzin, S. und Hamprecht, B., FEBS Lett. 49, 260 (1974).
- (57) Sharma, S.K., Klee, W.A. und Nirenberg, M., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 72, 590 (1975).
- (58) Gullis, R., Traber, J. und Hamprecht, B., Nature 256, 57 (1975).
- (59) Klee, W.A. und Nirenberg, M., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 71, 3474 (1974).
- (60) Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L. und Sweet, W., Science 161, 370 (1968).
- (61) Perkins, J.P., MacIntyre, E.H., Riley, W.D. und Clark, R.B., Life Sci. 10, 1069 (1971).
- (62) Pfeiffer, S.E. und Wechsler, W., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 69, 2885 (1972).
- (63) Hamprecht, B., Jaffe, B.M. und Philpott, G.W., FEBS Lett. 36, 193 (1973).
- (64) Gilman, A.G. und Nirenberg, M., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 68, 2165 (1971).
- (65) Hamprecht, B. und Schultz, J., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 354, 1633 (1973).
- (66) Hamprecht, B., Kemper, W. und Amano, T., Brain Res. 101, 129 (1976).
- (67) Amano, T., Hamprecht, B. und Kemper, W., Exp. Cell Res. 85, 399 (1974).
- (68) Harris, H. und Watkins, J.F., Nature 205, 640 (1965).
- (69) Okada, Y., Biken's J. 1, 103 (1958).
- (70) Okada, Y., Exp. Cell Res. 26, 98 (1962).
- (71) Hamprecht, B., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 355, 109 (1974).
- (72) Hamprecht, B., in Biochemistry of Sensory Functions, Herausgeber L. Jaenicke, Mosbacher Kolloquium 25, 391 (1974).
- (73) Hamprecht, B. und Amano, T., Exp. Cell Res. im Druck.
- (74) Daniels, M.P. und Hamprecht, B., J. Cell Biol. 63, 691 (1974).

- (75) Traber, J., Gullis, R. und Hamprecht, B., Proc. 10th Congr. Fed. Eur. Biochem. Soc., Paris, 165 (1975).
- (76) Traber, J., Fischer, K., Latzin, S. und Hamprecht, B., Nature 253, 120 (1975).
- (77) Traber, J., Gullis, R. und Hamprecht, B., Life Sci. 16, 1863-1868 (1975).
- (78) Traber, J. und Hamprecht, B., in Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research, herausgegeben von B. Samuelsson und R. Paoletti, Vol. 1, Raven Press, New York, (1975).
- (79) Klee, W.A., Sharma, S.K. und Nirenberg, M., Life Sci. 16, 1869 (1975).
- (80) Sharma, S.K., Klee, W.A. und Nirenberg, M., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 72, 3092 (1975).
- (81) Haffke, S.C. und Seeds, N.W., Life Sci. 16, 1649 (1975).
- (82) Richelson, E., Nature New Biol. 242, 175 (1973).
- (83) Weiss, B., Shein, H. und Uzunov, P., Fed. Proc. 32, 679, (1973).
- (84) Schultz, J., Hamprecht, B. und Daly, J.W., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 69, 1266 (1972).
- (85) Traber, J., Gullis, R., Fischer, K., Buchen, C. und Hamprecht, B., in Vorbereitung.
- (86) Kurzrok, R. und Lieb, C.C., II. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 26, 268 (1930).
- (87) Euler, U.S. von, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Exp. Path. Pharmac. 175, 78 (1934).
- (88) Goldblatt, M.W., J. Physiol. (London) 84, 208 (1935).
- (89) Bergström, S., Recent Progress in Hormone Research, 22, 153 (1966).
- (90) Nugteren, D.H., van Dorp, D.A., Bergström, S., Hamberg, M. und Samuelson, B., Nature 212, 38 (1966).
- (91) Horton, E.W., Prostaglandins, Monographs on Endocrinology, Vol. 7, Springer-Verlag (1972).
- (92) Prostaglandins, herausgegeben von P. Ramwell und J.E. Shaw, Ann.N.Y. Acad. Sci. 180, (1971).

- (93) The Prostaglandins, herausgegeben von P.W. Ramwell, Plenum Press, New York - London (1973).
- (94) The Prostaglandins, Pharmacological and Therapeutic Advances, herausgegeben von M.F. Cuthbert, William Heinemann Medical Books LTD., London (1973).
- (95) Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research, Vol. 1 and 2, herausgegeben von B. Samuelsson and R. Paoletti, Raven Press, New York (1975).
- (96) Advances in the Biosciences, 9. International Conference on Prostaglandins, Vienna, 1972 herausgegeben von S. Bergström, Pergamon Oxford und Vieweg, Braunschweig (1973).
- (97) Euler, U.S. von, Eliasson, R. in Medicinal Chemistry, herausgegeben von G. de Stevens, Vol. 8, Prostaglandins, Academic Press, New York (1967).
- (98) Bergström, S., Carlson, L.A. und Weeks, J.R., Pharmacol. Revs. 20, 1 (1968).
- (99) Karim, S.M.M. und Hillier, Drugs 8, 176 (1974).
- (100) Hamberg, M. und Samuelsson, B., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 70, 899 (1973).
- (101) Green, K., in Advances in the Biosciences, 9. International Conference on Prostaglandins, Vienna, 1972, herausgegeben von S. Bergström, Pergamon Oxford und Vieweg, Braunschweig (1973) S. 91.
- (102) Axen u. Baczynskyi, L., Duchamp, D.J., Kirton, K.T. und Zieserl jr., J.F., in (96), S. 109.
- (103) Jaffe, B.M., Behrman, H.R. und Parker, C.W., J. Clin. Invest. 52, 398 (1973).
- (104) Jaffe, B.M. und Behrman, H.R., Methods of Hormone Radioimmunoassay, S. 19, Academic Press, New York, London (1974).
- (105) Önggö, E. und Samuelsson, B., J. Biol. Chem. 239, 4097 (1964).
- (106) Bergström, S., Ryhage, R., Samuelsson, B. und Sjövall, J., J. Biol. Chem. 238, 3555 (1963).

- (107) Flower, J.F., Pharmacol. Revs. 26, 33 (1974).
- (108) Mangold, K.H. in Dünnschicht-Chromatographie herausgegeben von E. Stahl, Springer-Verlag, Berlin, 383 (1967).
- (109) Kunze, H. und Vogt, W., in (92), S. 123.
- (110) Gullis, R.J. und Rowe, Ch.E., Biochem. J. 148, 197 (1975).
- (111) Gullis, R.J. und Rowe, Ch.E., Biochem. J. 148, 557 (1975).
- (112) Gullis, R.J. und Rowe, Ch.E., Biochem. J. 148, 567 (1975).
- (113) Robison, G.A., Butcher, R.W. und Sutherland, E.W., in Cyclic AMP, Academic Press, New York, London (1971).
- (114) Sutherland, E.W., Øye, I. und Butcher, R.W., Rec. Progr. Horm. Res. 21, 623 (1965).
- (115) Goldberg, N.D., Haddox, M.K., Hartle, D.K. und Hadden, J.W., Pharmacology and the Future of Man, Proc. 5th Int. Congr. Pharmacology, San Francisco, 1972, vol. 5, 146, Karger, Basel (1973).
- (116) Gilman, A.G. und Schrier, B.K., Molec. Pharmacol. 8, 410 (1972).
- (117) Van Calker, D., unveröffentlichte Ergebnisse.
- (118) Collier, H.O.J. und Roy, A.C., Nature 248, 24 (1974).
- (119) Uzunov, P. und Weiss, B., Biochim. Biophys. Acta 284, 220 (1972).
- (120) Uzunov, P., Shein, H.M. und Weiss, B., Neuropharmacol. 13, 377 (1974).
- (121) Asano, T. und Hidaka, H., Biochim. Biophys. Acta 397, 124 (1975).
- (122) Gerisch, G., Malchow, D., Riedel, V., Müller, E. und Every, M., Nature New Biol. 235, 90 (1972).
- (123) Gilman, A.G., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 67, 305 (1970).
- (124) Fried, J., Lin, C., Mehra, M., Kao, W. und Dalven, P. in (92) S. 38.
- (125) Sanner, J., Arch. int. Pharmacodyn. 180, 46 (1969).
- (126) Sanner, J. in (92) S. 396.
- (127) Jacques, R., Experientia 25, 1059 (1969).

- (128) Henderson, Th., Ariens, E.J. und Simonis, A.N., *Europ. J. Pharmacol.* 4, 62 (1968).
- (129) Coceani, F. und Wolfe, L.S., *Canad. J. Physiol. Pharmacol.* 44, 933 (1966).
- (130) Bennet, A. und Fleshler, B., *Brit. J. Pharmacol.* 35, 351 (1969).
- (131) Kantor, H.S., Tao, P. und Kiefer, H.C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 71, 1317 (1974).
- (132) Engel, J.J., Scruggs, W. und Wilson, D.E., *Prostaglandins* 4, 65 (1973).
- (133) Broadus, A.E., Hardman, J.G., Kaminsky, N.I., Ball, J.H., Sutherland, E.W., und Liddle, G.W., in *Cyclic AMP and Cell Function*, herausgegeben von G.A. Robison, G.G. Nahas und L. Triner, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 185, 50 (1971).
- (134) Doore, B.J., Bashor, M.M., Spitzer, N., Mawe, R.C. und Saier jr., M.H., *J. Biol. Chem.* 250, 4371 (1975).
- (135) Manganiello, V. und Vaughan, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 69, 269 (1972).
- (136) D'Armiento, M., Johnson, G.S. und Pastan, I., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 69, 459 (1972).
- (137) Russell, T.R. und Pastan, I.H., *J. Biol. Chem.* 249, 7764 (1974).
- (138) Gullis, R.J., unveröffentlichte Ergebnisse.
- (139) Newcombe, D.S., Ciosek, C.P., Ishikawa, Y. und Fahey, J.V., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 72, 3124 (1975).
- (140) Burnstock, G., *Pharmacol. Rev.* 24, 509 (1972).
- (141) Scholfield, C.N., *Pharmacologist* 16, 242 (1974).
- (142) Blume, A.J. und Foster, C.J., *J. Biol. Chem.* 250, 5003 (1975).
- (143) Shimizu, H. und Daly, J., *Biochim. Biophys. Acta* 222, 465 (1970).
- (144) Schultz, J., *J. Neurochem.* 24, 1237 (1975).
- (145) Sattin, A. und Rall, T.W., *Molec. Pharmacol.* 6, 13 (1970).
- (146) Huang, M. und Daly, J.W., *Life Sci.* 14, 489 (1974).
- (147) Schultz, J. und Daly, J.W., *J. Biol. Chem.* 248, 853 (1973).

- (148) Schultz, J. und Daly, J.W., J. Biol. Chem. 248, 860 (1973).
- (149) Schultz, J. und Hamprecht, B., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 278, 215 (1973).
- (150) Clark, R.B., Gross, R., Su, Y.-F. und Perkins, J.P., J. Biol. Chem. 249, 5296 (1974).
- (151) Mills, D.C.B. und Smith, J.B., Biochem. J. 121, 185 (1971).
- (152) Haslam, R.J. und Rosson, G.M., Molec. Pharmacol. 11, 528 (1975).
- (153) Fain, J.N., Pointer, R.H. und Ward, W.F., J. Biol. Chem. 247, 6866 (1972).
- (154) Fain, J.N., Molec. Pharmacol. 9, 595 (1973).
- (155) Jaffe, J.H. in The Pharmacological Basis of Therapeutics, 4. Ausgabe, herausgegeben von L.S. Goodman und A. Gilman, MacMillan, London, S. 237 (1970).
- (156) Robinson, F.M. in Ann. Rep. Med. Chem. Vol. 7, Chapter 3, S. 31 (1972).
- (157) Portoghese, P.S., in Ann. Rev. Pharmacol. 10, 71 (1970).
- (158) Pert, C.B., Kuhar, M.J. und Snyder, S.H., Life Sci. 16, 1849 (1975).
- (159) Schubert, P., Höllt, V. und Herz, A., Life Sci. 16, 1855 (1975).
- (160) Pert, C.B. und Snyder, S.H., Science 179, 1011 (1973).
- (161) Goldstein, A., Life Sci., 14, 615 (1974).
- (162) Hiller, J.M., Pearson, J. und Simon, E.J., Res. Comm. Chem. Path. Pharmacol. 6, 1052 (1973).
- (163) Kuhar, M.J., Pert, C.B. und Snyder, S.H., Nature 245, 447 (1973).
- (164) Davies, J. und Duggan, A.W., Nature 250, 70 (1974).
- (165) Dingledine, R. und Goldstein, A., Life Sci. 17, 57 (1975).
- (166) Satoh, M., Zieglgänsberger, W. und Herz, A., Life Sci. 17, 75 (1975).
- (167) Satoh, M., Zieglgänsberger, W., Fries, W. und Herz, A., Brain Res. 82, 378 (1974).

- (168) Bradley, P.B. und Bramwell, G.J., J. de Pharmacologie 5, 10 (1974).
- (169) Traber, J., Diplomarbeit, Universität München (1973).
- (170) Jasinski, D.R., Martin, W.R. und Haertzen, C.A., J. Pharmac. exp. Ther. 157, 420 (1967).
- (171) Glees, P., Das Menschliche Gehirn, Hippokrates-Verlag Stuttgart (1971).
- (172) Jänig, W., in Grundriß der Neurophysiologie, herausgegeben von R.F. Schmidt, Springer Verlag, Berlin (1972).
- (173) Noback, C.R. und Demarest, R.J., The human nervous system, McGraw-Hill, New York (1975).
- (174) The Pharmacological Basis of Therapeutics, herausgegeben von L.S. Goodman und A. Gilman, Mac Millan, London, Section IV, S. 402, 4. Ausgabe (1970).
- (175) Heumann, R., unveröffentlichte Ergebnisse.
- (176) Miledi, R. und Potter, L.T., Nature 233, 599 (1971).
- (177) Ashman, D.F., Lipton, R., Melicow, M.M. und Price, T.D., Biochem. Biophys. Res. Commun. 11, 330 (1963).
- (178) George, W.J., Polson, J.B., O'Toole, A.G. und Goldberg, N.D., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 66, 398 (1970).
- (179) Seifert, W.E. und Rudland, P.S., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 71, 4920 (1974).
- (180) Goldberg, N.D., O'Dea, R.F. und Haddox, M.K., Adv. Cyclic Nucl. Res. 3, 155 (1973).
- (181) Glass, D.B., White, J.G. und Goldberg, N.D., Fedn. Proc. 33, 611 (1974).
- (182) Moskowitz, J. und Krishna, G., Pharmacology 10, 129 (1973).
- (183) Terenius, L. und Wahlström, A., Acta Pharmacol. Toxicol. 35, Suppl. 1, 55 (1974).
- (184) Hughes, J., Brain Res. 88, 295 (1975).
- (185) Hughes, J., Neurosciences Res. Progr. Bull. 13, 55 (1975).
- (186) Hughes, J., Life Sci. 16, 1753 (1975).
- (187) Terenius, L. und Wahlström, A., Life Sci. 16, 1759 (1975).
- (188) Pasternak, G.W., Goodman, R. und Snyder, S.H., Life Sci. 16, 1765 (1975).

- (189) Cox, B.M., Opheim, K.E., Teschenmacher, H. und Goldstein, A., Life Sci. 16, 1777 (1975).
- (190) Hughes, T., Smith, T.W., Kosterlitz, H.W., Fothergill, L.A., Morgan, B.A. und Morris, H.R., Nature 258, 577 (1975).
- (191) Brandt, M., unveröffentlichte Ergebnisse.
- (192) Ho, I.K., Loh, H.H. und Way, E.L., J. Pharmac. exp. Ther. 185, 336 (1973).
- (193) Contreras, E., Castillo, S. und Quaida, L., J. Pharm. Pharmac. 24, 65 (1972).
- (194) Collier, H.O.J. und Roy, A.C., Prostaglandins 7, 361 (1974).
- (195) Collier, H.O.J. und Schneider, C., Nature New Biol. 236, 141 (1972).
- (196) Ferreira, S.H., Moncada, S. und Vane, J.R., Br. J. Pharmac. 49, 86 (1973).
- (197) Feldberg, W. und Milton, A.S. in The Pharmacology of Thermoregulation, herausgegeben von E. Schönbaum und P. Lomax, S. 302, Karger, Basel (1973).
- (198) Coceani, F., Arch. intern. Med. 133, 119 (1974).
- (199) Laburn, H.P., Rosendorff, C., Willies, G. und Woolf, C., J. Physiol. (Lond.) 240, 49 (1974).
- (200) Lotti, V.J. in The Pharmacology of Thermoregulation, herausgegeben von E. Schönbaum und P. Lomax, S. 382, Karger, Basel (1973).
- 20 Vane, J.R., Nature New Biol. 231, 232 (1971).
- 202) Mattila, M.J. und Saarnivaara, L., Ann. Med. exp. Fenn. 45, 364 (1967).
- (203) Want, R.I.H. und Sandoval, R.G., J. Clin. Pharmac. 11, 310 (1971).
- 204) Levine, R.A., Clin. Pharmac. Ther. 11, 238 (1970).
- (205) Misiewicz, J.J., Waller, S.L., Kiley, N. und Horton, E.W., Lancet 1, 648 (1969).
- (206) Weiner, M. und Olson, J.W., Life Sci. 12, 345 (1973).

- (207) Kimberg, D.V., Field, M., Johnson, J., Henderson, A. und Gershon, E., J. clin. Invest. 50, 1218 (1971).
- (208) Goldstein, A. und Sheehan, P., J. Pharmac. exp. Ther. 169, 175 (1969).
- (209) Reynolds, A.K. und Randall, L.O., Morphine und Allied Drugs, University of Toronto (1957).
- (210) Van Calker, D., unveröffentlichte Ergebnisse.
- (211) Klee, W.A. und Streaty, R.A., Nature 248, 61 (1974).
- (212) Smith, A., Gavitt, J. und Karmin, M., J. Pharmacol. Exp. Ther. 156, 85 (1967).
- (213) Loh, H.H., Shen, F.H. und Way, E.L., Biochem. Pharmacol. 18, 2711 (1969).
- (214) Feinberg, M.P. und Cochin, J. Biochem. Pharmacol. 21, 3082 (1972).
- (215) Traber, J., unveröffentlichte Ergebnisse.
- (216) Heumann, R., Öcalan, M. und Hamprecht, B., in Vorbereitung.
- (217) Collier, H.O.J. und Francis, D.L., Nature 255, 159 (1975).
- (218) Clark, A.G., Jovic, R., Ornellas, M.R. und Weller, M., Biochem. Pharmac. 21, 1989 (1972).
- (219) Ho, I.K., Loh, H.H. und Way, E.L., J. Pharmac. exp. Ther. 185, 347 (1973).
- (220) Wei, E., Life Sci. 17, 17 (1975).
- (221) Reinhold, K., Bläsigg, J. und Herz, A., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 278, 69 (1973).
- (222) Dewey, W.L., Cocolas, G., Daves, E., Pedigo, N. und Harris, L.S., in Acute Effects of Narcotic Analgesics, Abstracts 6th Int. Congr. Pharmacol., Norkkala, Finnland, S. 54 (1975).
- (223) Bradykinin and related Kinins, herausgegeben von Sicuteri, F., Rocha e Silva, M. und Back, N., Plenum Press, New York - London (1970).
- (224) Erspamer, V., Ann. Rev. Pharmacol. 11, 327 (1971).
- (225) Leeman, S.E. und Mroz, E.A., Life Sci. 15, 2033 (1975).
- (226) Lembeck, F., Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 219, 197 (1953).

- (227) Otsuka, M., Konishi, S. und Takahashi, T., Proc. Japan. Acad. 48, 342 (1972).
- (228) Hökfelt, T., Kellerth, T.O. Nilsson, G. und Pernow, B., Brain Res. 100, 235 (1975).
- (229) Ueda, E., Kokubu, T., Akutsu, H. und Yamamura, Y., Experientia 27, 1020 (1971).
- (230) Erspamer, V. und Boretti, G., Arch. int. Pharmacodyn. 88, 296 (1951).
- (231) Carpenter, D.O. und Gaubatz, G.L., Nature 252, 483 (1974).
- (232) Molinoff, P.B. und Axelrod, J., J. Neurochem. 19, 157 (1972).
- (233) Honegger, C.G. und Honegger, R., Nature 185, 530 (1960).
- (234) Nixon, R., Anal Biochem. 48, 460 (1972).
- (235) Wei, E., Mitteilung auf dem 6th Internatl. Congress of Pharmacology, Nokkala, Finnland (1975).
- (236) Grimm-Jørgensen, Y., McKelvy, J.F., Jackson, I.M.D., Nature 254, 620 (1975).
- (237) Noonan, K.D. und Burger, M.M., in Progr. in Surface and Membr. Science, herausgegeben von D.A. Cadenhead, J.F. Danielli, M.N. Rosenberg, Vol. 8, S. 245, Academic Press, New York, London (1974).
- (238) Parker, C.W., Smith, J.W. und Steiner, A.L., Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 41, 40 (1971).
- (239) Lyle, L.R., Liebhafner, H.R. und Parker, C.W., Fed. Proc. 33, 794 (1974).
- (240) Littlefield, J.W., Biochim. Biophys. Acta 95, 14 (1965).
- (241) Littlefield, J.W., Nature 203, 1142 (1964).
- (242) Littlefield, J.W., Exp. Cell. Res. 41, 190 (1966).
- (243) Minna, J., Glazer, D. und Nirenberg, M., Nature New Biol. 235, 225 (1972).
- (244) Miyamoto, E., Kuo, J.F. und Greengard, P., J. Biol. Chem. 244, 6395 (1969).
- (245) Schultz, J. und Daly, J.W., J. Biol. Chem. 248, 844 (1973).
- (246) Gullis, R.J., unveröffentlichte Ergebnisse.

- (247) Stahl, E., Dünnschicht Chromatographie, S. 848,
Springer Verlag, Berlin (1967).
- (248) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall,
R.J., J. Biol. Chem. 193, 265 (1951).
- (249) Hamprecht, B., Angew. Chem. und Angew. Chem. Int. Ed.,
im Druck.

Lebenslauf

22. September 1946 : geboren in Stuttgart als Sohn des Kfz.-Mechanikermeisters Helmut Traber und seiner Ehefrau Gretel, geb. Brendemühl.
- April 1953 bis März 1957 : Besuch der Volksschule in Stuttgart
- April 1957 bis März 1966 : Besuch des Dillmann-Gymnasiums Stuttgart, Abschluß mit der Reifeprüfung.
- April 1966 bis März 1968 : Militärdienst in Ulm/Donau
- April 1968 : Beginn des Chemiestudiums an der Universität München.
- April 1970 : Diplomvorprüfung
- Juli 1972 : mündliche Diplomhauptprüfung
- Oktober 1972 bis
Dezember 1972 : Aufenthalt am National Heart and Lung Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.
- ab Januar 1973 bis
Dezember 1975 : Ausführung vorliegender Diplom- und Doktorarbeit unter der Anleitung von Dr. B. Hamprecht, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried (Leitung Prof. F. Lynen).
- September 1973 : Abschluß der Diplomhauptprüfung.
- August 1975 : Eheschließung mit Monika Schütte.

